



**DIVERSIDADE DO COMPLEXO *Colletotrichum*  
E DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO POR  
MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

**RENATA SILVA MANN**

**2002**

53471

37855MFW

**RENATA SILVA MANN**

**DIVERSIDADE DO COMPLEXO *Colletotrichum* E  
DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO POR MEIO  
DE MARCADORES MOLECULARES**

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

Orientadora

Profa. Maria das Graças G. C. Vieira.

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2002

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

**Mann, Renata Silva**

Diversidade do complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares / Renata Silva Mann. -- Lavras : UFLA, 2002.  
146 p. : il.

**Orientador: Maria das Graças G. C. Vieira.**

**Tese (Doutorado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

1. Algodão. 2. Marcador molecular. 3. *Colletotrichum*. 4. AFLP. 5. Fungo patógeno. 6. Antracnose. 7. Ramulose. I. Universidade Federal de Lavras. II.

**Título.**

CDD-633.5194

**RENATA SILVA MANN**

**DIVERSIDADE DO COMPLEXO *Colletotrichum* E  
DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO POR MEIO  
DE MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Agronomia, Fitotecnia,  
para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 19 de Fevereiro de 2002

Pesquisador Leonardo Cunha Melo

UFU

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho

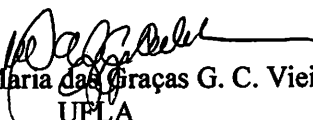
UFLA

Profa. Dr. Édila de Vilela de Resende Von Pinho

UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado

UFLA

  
Profa. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira.

UFLA

(Orientador)

MINAS GERAIS – BRASIL  
LAVRAS

A meus pais, Vitor e Josefa.

Aos meus irmãos, Anízio, Glória e Elma; e sobrinhos, Emanuel e Daniel...

***OFEREÇO.***

A meu esposo, Eliseu, pelos momentos de compreensão, carinho e incentivo...

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por cultivar e fazer crescer a conquista de um ideal.

A minha família, pelo apoio constante em todas as escolhas.

À Universidade Federal de Lavras, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Brigham Young University pela oportunidade e pela bolsa concedida.

Aos colegas, Susana Mogensen, Dorine Jespersen, Matthew and Heidi Robins, Brian Gardunia, Ryan Walker, Susan Parkinson, Per McCord, Jennifer Waters, Jonathan Lamb e Jolynn Stevens, pela convivência e amizade durante o estágio no exterior.

À amiga e orientadora Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, pela orientação e pela confiança.

Aos professores do comitê de orientação, José da Cruz Machado, Antonio Carlos Fraga e Mikel Ross Stevens, pelas sugestões e incentivo.

Aos professores, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dulcinéia de Carvalho, José Almir, Renato de Castro, Renato Guimarães, João Bosco dos Santos, pelo companheirismo, incentivo e sugestões.

Aos amigos, Kalinka Carla Salgado, José Roberto Bernardino Filho, Marcelo de Carvalho Alves, João Vieira Monteiro, Rodrigo da Cunha Serpa, pela valiosa contribuição técnica na montagem dos experimentos.

Aos amigos, Elisa Serra Negra, Lílian Padilha, Robério Anastácio Ferreira, Andrea de Lourdes Silva, Elza Teodoro, Ana Lucia Pereira Kikuti, Maria de Lourdes Resende, Sebastião Carneiro Guimarães, Solange Carvalho Barrios Roveri Jose, pela amizade e apoio constantes.

Aos pesquisadores, Gilma da Silva Chitarra (CPRO-Wageningen University), Maria Aparecida de Souza Tanaka (IAC), Maria Angélica Pizzinato

(IAC), Edvaldo Cia (IAC) e Joel Falieri (EPAMIG) pela concessão do material biológico para execução do trabalho e sugestões.

Aos professores, funcionários e colegas de pós-graduação do Departamento de Agricultura da UFLA, pela convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório de Análise de sementes da UFLA.

Aos amigos e professores, João Luis da Silva Filho, João Cândido de Souza e Leonardo Cunha Melo, pela valiosa contribuição na área estatística.

## BIOGRAFIA

Renata Silva Mann, filha de Vitor Batista da Silva e Josefa Brasilina Vieira da Silva, nasceu em 22 de dezembro de 1964, em Campinas, Estado de São Paulo.

No período de 1980 a 1983, cursou o Técnico em Bioquímica na Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antonio Prado” (ETECAP), em Campinas-SP.

Em agosto de 1988 foi aprovada no concurso vestibular para o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Lavras, na época Escola Superior de Agricultura de Lavras.

De 1989 a 1990 foi monitora da disciplina Citologia, pelo Departamento de Biologia- UFLA.

No período de 1990 a 1993 foi bolsista de Iniciação Científica – CNPq.

Diplomou-se em Engenharia Agrônômica, em julho de 1993, na UFLA.

Em agosto de 1993, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas (UFLA).

Em 29 de fevereiro de 1996, defendeu dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de Mestre.

Em março de 1996, atuou no Departamento de Agricultura por um ano como bolsista DTI-RHAE (CNPq), trabalhando em projeto “Biotecnologia aplicada a sementes”.

Em setembro de 1997, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia (UFLA).

No período de 2000 a 2001, participou do Programa Sandwich (CAPES), no qual executou parte da tese na Brigham Young University, Provo-Utah (USA).

Em 19 fevereiro de 2002, defendeu tese, requisito indispensável para obtenção do título de Doutor.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Etiologia e sintomatologia de <i>C. gossypii</i> (South) e <i>Colletotrichum gossypii</i> (South) var. <i>cephalosporioides</i> A. S. Costa.....	03
2.2 Mecanismos de variabilidade dos fungos.....	06
2.3 Técnicas empregadas na diagnose de fungos em sementes.....	11
2.3.1 Técnicas moleculares utilizadas na identificação e diferenciação de fungos.....	12
3. Caracterização de cultivares.....	22
4. Interação entre patógenos e plantas.....	30
4.1 Respostas à interação entre patógenos e hospedeiros.....	31
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO 2: Emprego de marcadores AFLP para diferenciação de isolados típicos de <i>Colletotrichum gossypii</i> e de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> associados ao algodoeiro.....	53
1 RESUMO.....	53
2 ABSTRACT.....	55
3 INTRODUÇÃO.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CAPÍTULO 3: Variabilidade genética em isolados do complexo <i>Colletotrichum</i> associados à sementes e plantas de algodoeiro usando marcadores AFLP.....	75
1 RESUMO.....	75
2 ABSTRACT.....	77
3 INTRODUÇÃO.....	78

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES.....	91
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
CAPÍTULO 4: Diversidade genética em cultivares de algodoeiro por meio de proteínas e marcadores moleculares AFLP.....	95
1 RESUMO.....	95
2 ABSTRACT.....	97
3 INTRODUÇÃO.....	99
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
6 CONCLUSÕES.....	111
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
CAPÍTULO 5: Estabilidade do descritor reação a ramulose na proteção e registro de cultivares de algodoeiro.....	115
1 RESUMO.....	115
2 ABSTRACT.....	117
3 INTRODUÇÃO.....	119
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	121
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
6 CONCLUSÕES.....	132
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
ANEXOS.....	140

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFLP</b>	"Amplified Fragment Length Polymorphism"- Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados.
<b>RFLP</b>	"Restriction Fragment Length Polymorphism"- Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição.
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction"- Reação de Polimerase em Cadeia.
<b>RAPD</b>	"Random Amplified Polymorphic DNA"- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso.
<b>RNAs</b>	Ácido Ribonucleico de fita dupla.
<b>SCAR</b>	"Sequence Characterized Amplified Regions"-Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequência
<b>VNTR</b>	"Variable Number of Tandem Repeat"- Número Variável de Sequências Repetidas em Tandem.
<b>PFGE</b>	"Pulsed Field Gel Electrophoresis"- Eletroforese de Campo Pulsado.
<b>ITS</b>	"Internal Transcribed Spacers"- Regiões Espaçadoras Internas.
<b>IGS</b>	"Intergens Spacer"-Espaçador entre Genes.
<b>STS</b>	"Sequence Tagged Sites"-Sítios Marcados por Sequências.
<b>SSR</b>	"Simple Sequence Repeats"- Sequências Simples Repetidas.
<b>ISSR</b>	"Inter Simple Sequence Repeat"-Inter Simples Sequências Repetidas.
<b>ISTA</b>	International Seed Testing Association.
<b>AOSA</b>	Association of Official Seed Analysis.
<b>CGR</b>	Capacidade Geral de Reação.
<b>CGA</b>	Capacidade Específica de Agressividade.
<b>CEI</b>	Capacidade Específica de Interação.

## RESUMO

MANN, Renata Silva. Diversidade do Complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares. Lavras: UFLA, 2001.(Tese-Doutorado em Fitotecnia)\*.

Em anos recentes, com a tecnificação da lavoura algodoeira, novas variedades têm sido liberadas para cultivo comercial e isso tem gerado uma grande preocupação com os aspectos relacionados à sanidade e proteção que são importantes para o sucesso do sistema de produção, bem como para a comercialização de sementes. Nesse âmbito 4 trabalhos de pesquisa foram conduzidos na Universidade Federal de Lavras (UFLA), e na Brigham Young University (BYU). Em um dos trabalhos a viabilidade do uso de marcadores moleculares do tipo AFLP, foram empregados na diferenciação de 10 isolados, do Complexo *Colletotrichum*, sendo 5 causadores da antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e 5 causadores da ramulose (*C. g.* var. *cephalosporioides*). Foi verificado que por meio da utilização de marcadores moleculares do tipo AFLP é possível diferenciar os isolados causadores da ramulose. No segundo trabalho avaliou-se a variabilidade de 49 isolados do Complexo *Colletotrichum* do algodoeiro. Alta variabilidade foi encontrada, em que valores de similaridade variaram de 10,85% a 99,03%. No terceiro trabalho, avaliou-se a similaridade genética de 11 variedades de algodoeiro IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce (Epamig-5), Precoce Liça, Precoce Alva, Redenção, Delta Opal, IAC-20, IAC-21 e Deltapine, por meio de marcadores moleculares do tipo AFLP e marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor. Os marcadores AFLP detectaram baixo polimorfismo e agruparam as cultivares, em função do grau de parentesco e da precocidade. Os marcadores bioquímicos foram polimórficos, e apresentam-se como uma alternativa para a obtenção de descritores bioquímicos. No quarto trabalho, foi estimada a Capacidade Específica de Interação (CEI), a Capacidade Geral de Reação (CGR) e Capacidade Geral de Agressividade (CGA), por meio de dados de patogenicidade obtidos de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* inoculados em diferentes cultivares de algodoeiro, visando a avaliar a estabilidade do descritor reação à ramulose. Da forma como esse marcador vem sendo empregado, o mesmo de mostra instável, uma vez que novos isolados mais agressivos existem, os quais nem sempre são testados nos experimentos de lançamento de novas cultivares.

---

\*Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

## ABSTRACT

MANN, Renata Silva. **Diversity of the *Colletotrichum* complex and cotton cultivars by molecular markers.** Lavras: UFLA, 2002. 146 p. (Thesis – Doctor degree in Crop Science\*).

Recently with the implantation of cotton planting technology, new varieties have been released for commercial cultivation. This has caused concern with topics related to health and protection that are important for the success of the production system, as well as for seed commercialization. Thus four research studies were carried out at the Federal University of Lavras (Lavras-MG, Brazil) and at Brigham Young University (Provo-UT, USA). In one of the studies the viability of the use of AFLP type molecular markers was used to differentiate ten isolates of the *Colletotrichum* complex, five that cause anthracnose (*Colletotrichum gossypii*) and five that cause ramulose (*C.g.* var *cephalosporioides*). AFLP type molecular markers could differentiate the ramulose-causing isolates. In the second study the variability of 49 isolates of the cotton *Colletotrichum* complex were assessed. High variability was found where similarity values varied from 10.85% to 99.03%. In the third study the genetic similarity was assessed in eleven cotton varieties, IAC-22, ITA-90, Precoce (Epamig-5), Precoce Liça, Precoce Alva, Redenção, Delta Opal, IAC-20, IAC-21 and Deltapine by AFLP type molecular markers and heat extracted protein biochemical markers. The AFLP markers detected low polymorphism and permitted grouping of the cultivars by the degree of parentesco and earliness. The biochemical markers were polymorphic and presented an alternative to obtain biochemical describers. In the fourth study, the Specific Interaction Ability (SIA), General Reaction Ability (CGA), and General Aggressivity Ability were assessed by pathogenicity data obtained from *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* isolates inoculated in different cotton cultivars, to assess the stability of describer resistance to ramulose. This marker has been shown to be unstable in the way it has been used, as new more aggressive isolates exist, which are not always tested in experiments for new cultivar release.

---

\* Guidance Committee: Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antonio Carlos Fraga – UFLA.

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Com a expansão e tecnificação da lavoura algodoeira a qualidade fitossanitária e características agronômicas de uma cultivar são importantes aspectos a se considerar quando se visa à produtividade dessa cultura, principalmente nas condições de cultivo no Brasil, onde existe diversidade de clima e de patógenos.

Dentre os patógenos que comprometem o desenvolvimento de culturas, os fungos são responsáveis pelas maiores perdas na agricultura, e a alta variabilidade e complexidade desses microrganismos tem levado pesquisadores a concentrarem esforços no sentido de detectar e identificar tais organismos.

Patógenos associados às sementes, como *Colletotrichum gossypii* (South) e *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa, causadores da antracnose e ramulose em algodoeiro, são de difícil identificação e distinção, e requerem métodos detalhados, rápidos e seguros em testes de sanidade.

Vários estudos têm enfatizado a importância e a versatilidade do uso de marcadores moleculares para a identificação de patógenos (Vieira, 1996; Silva-Mann et al., 2002). No entanto, vários aspectos ainda necessitam ser melhor pesquisados. Nesse sentido, os dois primeiros capítulos desse trabalho tratam da diferenciação entre os microrganismos causadores da antracnose e ramulose em algodoeiro, e da variabilidade desses avaliada por meio de marcadores moleculares e morfológicos, quando os mesmos estão em associação com plantas e sementes.

Além dos aspectos fitossanitários, as sementes agregam características agronômicas que são um somatório do trabalho conjunto de vários profissionais dentro do sistema de produção. Assim a proteção e registro de cultivares de

algodoeiro, podem assegurar direitos sobre materiais desenvolvidos, e para isso uma série de marcadores morfológicos e fisiológicos têm sido indicados, dentre eles a reação a doenças. Entretanto, esses descritores em determinadas situações podem apresentar-se instáveis, em função das condições ambientais e das interações entre patógenos e hospedeiros.

Tem sido crescente a busca de características distintas, estáveis e homogêneas; e que sirvam como descritores de cultivares. Algumas proteínas específicas têm sido sugeridas pela ISTA (International Seed Testing Association, 1996) e a AOSA (Association of Official Seed Analysis, 1991) para as diferentes espécies.

Padrões de expressão de proteínas durante o desenvolvimento das sementes têm sido estudados para a cultura do algodoeiro, como a descrição de um grupo de proteínas, robustas, hidrofílicas, que se acumulam durante os últimos estádios de desenvolvimento da semente e de natureza altamente conservada, supostamente relacionadas com tolerância à dessecação (Kigel & Galili, 1995). Essas têm mostrado padrões eletroforéticos variáveis entre cultivares e em sementes se mostram estáveis e homogêneas, apresentando-se como descritores promissores para a caracterização de cultivares.

Desta forma, os dois capítulos finais abordaram temas como o tipo de resistência envolvida na relação patógeno-hospedeiro com a finalidade de averiguar a estabilidade e homogeneidade deste tipo de descritor na certificação e proteção de cultivares e a viabilidade do uso de métodos eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor e de marcadores AFLP para a identificação de cultivares de algodoeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Etiologia e sintomatologia de *C. gossypii* (South) e *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa

O gênero *Colletotrichum* engloba muitas espécies que causam doenças denominadas antracnoses na maioria das espécies cultivadas e plantas ornamentais (Bailey & Jeger, 1992). As espécies deste gênero têm sido usadas por muitos anos em estudos relacionados com a diferenciação de fungos e interações entre planta e patógeno. Durante a colonização de plantas hospedeiras, os fungos fitopatogênicos exibem diferentes modos de nutrição: biotrófico, no qual os nutrientes são obtidos de células hospedeiras vivas, necrotrófico, onde os nutrientes são obtidos de células mortas do hospedeiro, e hemibiotrófico, no qual o patógeno inicialmente mantém as células vivas, mas as mata nos últimos estágios de infecção. Essas estratégias nutricionais são exibidas por espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, e esse processo de infecção, colonização, e reprodução do patógeno é conhecido como patogênese. Em adição, esses fungos desenvolvem uma série de estruturas de infecção especializadas incluindo tubos germinativos, apressórios, hifas intracelulares e hifas necróticas secundárias (Kimati, 1980).

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

*Colletotrichum gossypii* e o seu teleomorfo *Glomerella gossypii* inicialmente tinham sido descritos num grupo à parte de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* (Watkins, 1981), apesar de alguns estudos indicarem este como sendo

uma espécie (Arx, 1957). No entanto, estudos recentes suportam a teoria de que *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* se trata de um grupo distinto (Sutton, 1992).

*Colletotrichum gossypii* (South.) e *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa, agentes causal da antracnose e ramulose, assumem grande importância na cultura do algodoeiro. Ambos são frequentemente transportados, tanto externa como internamente, pelas sementes de algodoeiro, que se constituem na principal via de disseminação desses patógenos (Lima et al., 1985; Tanaka, 1995).

Esses organismos podem causar tombamento de pós-emergência, atacando o hospedeiro sempre no início do seu desenvolvimento, ocasionando redução do estande, pela sintomatologia, esses microrganismos se mostram distintos (Costa, 1937). A sintomatologia descrita para *Colletotrichum gossypii* é a de lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro, envolvendo todo o fruto. Dessa forma, o fungo também infecta as sementes que, posteriormente, originam plântulas com lesões avermelhadas na região do colo e raiz enegrecida. Dependendo das variedades de algodoeiro empregadas, as plântulas podem reagir ou morrer, provocando reduções no estande (Bitancourt, 1935; Pizzinato, 1987; Dudienas, 1990, Teixeira, 1995).

O agente causal da ramulose, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, em plantas jovens mostra sintomas mais rapidamente, sendo esses caracterizados por superbrotamento dos galhos, tornando a planta com um aspecto ramalhudo, porte baixo, galhos contorcidos e dilatados, folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas apresentam áreas cloróticas que evoluem para lesões necróticas arredondadas, alongadas ou angulares, às vezes, acompanhadas de perfurações. As lesões necróticas, deprimidas ou elevadas, algumas vezes fendilhadas, são observadas nas hastes e nos pecíolos das folhas. Nos estádios mais avançados, o patógeno causa a morte da gema apical,

estimulando as gemas axilares a formarem número excessivo de galhos, reduzindo conseqüentemente a frutificação (Abrahão & Costa, 1949; Abrahão, 1961; Drumond, 1961; Kimati, 1980; Costa & Fraga Junior, 1937; Tanaka, 1990; Dudienas, 1990; Tanaka, 1995).

A ramulose assume um importante papel em virtude das perdas que ocasionam à cultura do algodoeiro, após o estabelecimento dos plantios, que na maioria das vezes não podem ser reparadas (Kimati, 1980; Watkins, 1981; Tanaka & Menten, 1991; Pizzinato et al., 1994; Santos et al., 1993). No entanto, essa importância depende também das variedades empregadas, das condições climáticas, especialmente o alto índice pluviométrico e temperaturas entre 25 a 30° C (Kimati, 1980; Carvalho et al., 1988, 1986). Nessas condições a produção pode se reduzir fortemente ou ser quase nula (Abrahão & Costa, 1949; Abrahão, 1952; Cia, 1977).

Empregando-se testes de patogenicidade nem sempre se consegue discernir com clareza, quais são os patógenos envolvidos na sintomatologia de antracnose e de ramulose (Chitarra, 1996), por causa das variações na agressividade dos isolados (Dudienas, 1990; Tanaka, 1990; Tanaka & Menten, 1991).

Apesar de a ramulose ocupar um lugar de destaque entre as doenças que causam perdas em algodoeiro, em resultados dos testes de sanidade em rotina em sementes de algodoeiro, em geral apenas se relata a presença de *Colletotrichum gossypii*, sem que se especifique qual a variedade de patógeno que ocorre (Chitarra, 1996).

Isso pode gerar problemas futuros nos campos de produção, onde os padrões indicam que a ocorrência de 3 plantas apresentando ramulose, pode levar ao cancelamento desses campos, ocasionando sérios prejuízos imediatos na produtividade das lavouras ou perdas; e ainda podem comprometer futuros plantios, pela contaminação do solo pelos restos culturais e sementes.

## 2.2 Mecanismos de variabilidade dos fungos

Para a identificação e detecção de fungos fitopatogênicos, o conhecimento das estratégias que os mesmos lançam para ampliar variabilidade e conseqüentemente alcançar adaptabilidade é de grande importância. Essa variabilidade, quando avaliada, auxilia o fitopatologista na escolha do método de controle do patógeno, na escolha de metodologias em programas de melhoramento visando à resistência e especificamente em patologia de sementes, auxilia na escolha de técnicas mais adequadas para identificação desses microrganismos possibilitando diagnoses mais seguras.

A grande variabilidade que tem sido observada em fungos se expressa na maioria das vezes nos caracteres fenotípicos, os quais podem ser analisados usando testes morfológicos ou de patogenicidade. Hansen & Snyder em 1943 analisando a instabilidade em culturas fúngicas isoladas da natureza, observaram que mais da metade dos isolados (916), obtidos com base em um único esporo variou rapidamente na morfologia da colônia, no estado conidial passando de uma produção de conídios abundantes para um estado micelial com poucos conídios e abundantes hifas aéreas, sob condições de ambiente controlado. Muitos autores têm observado tais mudanças em diversos fungos, como por exemplo, os pertencentes ao gênero *Fusarium* e *Colletotrichum* (Bailey & Jeger, 1992). Essas mudanças ainda se estendem a alterações na especificidade por um determinado hospedeiro, no qual as progênies obtidas com base em um único esporo (teliosporos) de *Ustilago hordei*, foram capazes de infectar um grande número de cultivares de cevada (Pederson & Kiesling, 1979).

Após sucessivos cultivos *in vitro* de isolados que tiveram origem de um único esporo de *Magnaporthe grisea*, patógeno de arroz, os mesmos apresentaram variações nos testes de patogenicidade para outras gramíneas e também para o arroz (Giatogong & Frederikson, 1969). Para alguns

pesquisadores essa variação patogênica não tem sido aceita (Levy et al., 1991), ou ainda reduzem sua importância como um evento genético, ou sugerindo que tais variações sejam de ordem experimental, como erros no isolamento dos microrganismos. Tem se constatado que esse mesmo fungo produz alta frequência de mutantes morfológicos, frequência essa, diferente daquelas esperadas pela segregação mendeliana, com outras culturas obtidas por um único esporo. Mudanças no genoma de microrganismos como os fungos filamentosos, levam a uma série de variações fenotípicas que não são facilmente explicadas pelos mecanismos mendelianos de segregação.

Essa ampla variabilidade encontrada nos fungos pode ser explicada em parte, pela forma de reprodução. Quando o fungo apresenta reprodução sexual, que é a principal fonte de variabilidade na natureza, ele pode ser classificado como sendo a forma sexual, teleomórfica ou meiospórica. Quando a reprodução sexual não está presente em seu ciclo de vida ele pode ser classificado como a forma assexual, anamórfica ou mitospórica. Tanto as formas meiospóricas como a mitospórica são altamente variáveis e podem ser diferenciadas em tipos fisiológicos e genéticos (Sutton, 1992).

A reprodução sexual nem sempre é a única fonte de variabilidade em fungos na natureza, também existem relatos de fungos mitospóricos, isto é, sem o estágio sexual, que apresentam grande variabilidade quando cultivados em laboratório ou no campo. Um estudo realizado por McDonald e Martinez (1990), em *Mycosphaerella graminicola*, usando 93 isolados obtidos de um único campo de produção foram identificados como dois haplotipos distintos, definidos por 12 locos de RFLP. A mutação é a fonte básica de variação e a heterocariose, que é a fusão de núcleos de dois microrganismos, e a fusão de citoplasmas podem ser citadas como outras fontes de variação. Essa variação entre isolados de um campo, onde os fungos apresentam reprodução assexual, parece ser bem comum, e tem sido relatada em fungos que apresentam meiose

em parte do seu ciclo de vida, e também em fungos em que a meiose não é relatada. Tal variação pode ser explicada pela necessidade em se ampliar variabilidade, que para o microrganismo é sinal de adaptabilidade. Isso tem sido observado em *Fusarium oxysporum* que se reproduz inteiramente por processo assexual e mostra extrema variação no número de cromossomas. Já na forma sexual de *F. solani* (teleomorfo = *Nectria haematococco*), pode-se observar um menor grau de variação.

Outra fonte de variabilidade é a ocorrência do ciclo parassexual e anastomose, ou seja, união de hifas com posterior passagem de núcleos de uma célula para outra. Esses eventos podem levar à diploidização e à recombinação gênica seguida pela haploidização vegetativa, sem que ocorra a reprodução sexual (Roca Magallanes, 1997).

A recombinação sexual por meio do ciclo sexual, também tem sido relatada como fonte de variabilidade, como exemplo pode-se citar a ocorrência de formas variantes em populações naturais de *Phytophthora nicotianae* e *P. cactorum*, cujo caráter híbrido dos progenitores pode ser confirmado por meio da análise de isoenzimas (Veld et al., 1998). Outros mecanismos que podem ampliar a variabilidade em microrganismos são o polimorfismo cromossômico e a ocorrência de transposons (Kistler & Miao, 1992).

O polimorfismo cromossômico tem sido detectado com mais frequência com o advento da eletroforese de campo pulsado (PFGE), graças ao reduzido tamanho dos cromossomas das espécies fúngicas, que nem sempre são vistos ao microscópio. Trata-se de uma técnica de cariotipagem que separa os cromossomas das espécies em um gel de eletroforese de acordo com o seu tamanho. Como resultado são obtidos os chamados cariótipos moleculares, mostrando tanto variação no número, como no tamanho dos cromossomas (Kistler & Miao, 1992). Assim tem sido possível identificar uma grande alteração no grau de polimorfismo de cromossomas em populações naturais de

fungos fitopatogênicos. Masel e colaboradores (1990) encontraram por meio da eletroforese de campo pulsado, em *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Stylosanthes*, um grande polimorfismo cromossômico. Esse procedimento também foi relatado com *Ustilago maydis* coletado em Minnesota (USA) e na China. Todos os isolados tinham o mesmo cariótipo molecular, no entanto, apenas um mostrou um rearranjo, sugerindo uma translocação recíproca (Kinscherf & Leong, 1988). Essa translocação trata-se de um evento no qual ocorre a transferência de um segmento de um cromossoma para outro não homólogo, e quando os dois cromossomas trocam partes entre si, tem-se a translocação recíproca (Guerra, 1988).

Essa alteração no polimorfismo de cromossomas pode ocasionar alterações fenotípicas. A alteração cromossômica potencialmente afeta o fenótipo, como notado em *Cochliobolus heterostrophus*. Alguns isolados do patógeno produzem uma toxina seletiva para genótipos de milho com macho-esterilidade citoplasmática do tipo Texas. O cariótipo eletroforético desses isolados sugere a ocorrência de translocações, que podem estar relacionadas com a habilidade do fungo em produzir a toxina, tornando-se extremamente patogênico (Tzeng et al., 1992).

Em algumas espécies, além dos cromossomas que compõem o cariótipo normal, ditos cromossomas A, aparecem cromossomas extras, geralmente pequenos e heterocromáticos, chamados cromossomas B, cromossomas extranumerários, cromossomas acessórios ou não essenciais. Nas espécies que possuem esses cromossomas, o número deles por indivíduo é muito variável. A ocorrência desses cromossomas B também tem sido sugerida em fungos. Um cromossoma extranumerário que tem sido relatado é o cromossoma de 1,6 Mb de *Nectria haematococca*, que contém dois genes *pda* e *mak 1*, envolvidos na patogenicidade (Miao et al., 1989). Os cromossomas B são conhecidos por conterem a maioria do DNA repetitivo e poucos genes, e está se tornando claro

que eles não são inteiramente inertes, isto é, sem expressão (Kistler & Miao, 1992).

Tais cromossomas têm sido relatados em patógenos de animais e plantas. No entanto, a descoberta de que cromossomas B podem carregar genes de avirulência tem introduzido novos conceitos sobre a variabilidade em fungos fitopatogênicos, que também pode ser expressa em estratégias para atacar o hospedeiro (Kistler & Miao, 1992).

A ocorrência de plasmídios também tem sido relatada em fungos, e pode ser exposta como mais um fator para ampliar variabilidade. Em fungos filamentosos, os plasmídios são quase todos de localização mitocondrial. Estes são geralmente benignos, mas algumas vezes agem como parasitas letais. São transmitidos horizontalmente por heterocariose de organismo para organismo. Alguns alelos podem prevenir essa transmissão, outros facilitá-la, eliminando o plasmídio ou regulando sua atividade. Plasmídios têm sido transmitidos de *Neurospora intermedia* para *N. crasa* por anastomose afetando seu fenótipo (Kistler & Miao, 1992).

Outro fator que tem levado fungos fitopatogênicos a ampliar a variabilidade é o estresse ambiental. Um dos variantes morfológicos de *Ustilago hordei* apareceu após incubação a 52° C por 2 a 10 minutos, conseqüentemente tendo seu cariótipo eletroforético alterado. Esse evento está relacionado com a perda de partes cromossômicas, conseqüentemente afetando a expressão dos genes (Kistler & Miao, 1992).

Além dos fenômenos anteriormente relatados, que levam a alterações no material genético, os fungos filamentosos também podem conter os chamados genes saltadores ou transposons. Kinsey & Helber (1989), foram os primeiros a isolar um transposon de um fungo filamentoso. Neste estudo pode-se observar a ruptura de um gene denominado *am* do fungo *Neurospora*, que codifica para a enzima glutamato desidrogenase, pela inserção de um transposon.

Com base nos relatos anteriores pode-se verificar que existe uma série de eventos que possibilitam aos fungos alterações nos seus genomas e com isso ampliar variabilidade. Tais descrições permitem uma melhor compreensão de todos os fatores que podem estar envolvidos quando avaliamos populações fúngicas, bem como as interações de microrganismos em associação com plantas.

### 2.3 Técnicas empregadas na diagnose de fungos em sementes

A análise da sanidade permite identificar e quantificar os microrganismos associados às sementes. Fungos representam o maior grupo, seguido pelas bactérias e em menor proporção pelos vírus e nematóides. Esses microrganismos podem ser transportados aderidos à superfície da semente, no seu interior ou como parte de material inerte.

Até uma década atrás, a detecção e identificação de patógenos era limitada a métodos clássicos, que requeriam grande habilidade e conhecimento de taxonomia. Para a diagnose desses patógenos em sementes, testes eram efetuados visando a estimular esses microrganismos, a produzirem estruturas que permitiam sua identificação. Testes como o *blotter test*, ainda tem sido realizado como análise de rotina, para quase todas as espécies na avaliação do estado fitossanitário das sementes. Esses métodos, apesar de serem padronizados como testes de rotina, apresentam limitações, pois nem sempre permitem a diagnose precisa em termos de subespécie, variedades e raças (Tanaka & Menten, 1988; Tanaka, 1995 e Vieira, 1996).

Visando a uma melhor diagnose de patógenos em sementes, alguns estudos têm sido realizados, como sugestão de novas metodologias de diagnose. Dentre essas cita-se a investigação sobre a caracterização morfológica, auxonográfica e patogênica de organismos como *Colletotrichum gossypii* e *C.*

*gossypii* var. *cephalosporioides* (Costa, 1939; Tanaka & Menten, 1988; Sutton, 1980; Dudienas, 1990 e Tanaka, 1995). No entanto, esse tipo de investigação apresenta limitações quando se focaliza a análise de rotina, pois algumas investigações exigem descrições detalhadas de requerimentos nutricionais, bem como morfologia de estruturas como conídios e setas, que pode ser afetada pelas condições de cultivo, bem como com a experiência do analista.

A detecção e identificação de fungos fitopatogênicos tem aumentado em importância pela demanda de material de propagação livre de patógenos. Isso ocorre principalmente como resultado da necessidade em se reduzir a quantidade de químicos para eliminação de patógenos.

### **2.3.1 Técnicas moleculares utilizadas na identificação e diferenciação de fungos**

O uso de técnicas moleculares no estudo de fungos fitopatogênicos se iniciou com o trabalho de Kozlowski & Stepien (1982) com o objetivo de elucidar a taxonomia empregando o fungo *Aspergillus* spp.

Essas técnicas têm sido empregadas na análise da diversidade genética e no estudo das relações intra e interespecíficas de diferentes espécies, populações e indivíduos. Estudos dessa natureza têm sido efetuados pela análise de macromoléculas por meio do uso de marcadores moleculares, os quais se baseiam na variação encontrada em proteínas ou na própria seqüência de bases nitrogenadas que compõem os ácidos nucléicos, DNA e RNA (Schots et al., 1994).

Por um grande período de tempo as isoenzimas e demais proteínas foram os marcadores moleculares mais escolhidos (Alfenas, 1992; Crous et al., 1993; El-Gholl et al., 1993; Kaufmann & Weidemann, 1996). No entanto, com o

advento cada vez mais rápido do conhecimento em biologia molecular, os principais alvos passaram a ser as moléculas de ácidos nucléicos.

Os ácidos nucléicos possibilitam melhor entendimento da complexidade de fatores, que podem influenciar a variabilidade desses microrganismos. Essa variabilidade, que pode ser traduzida como estratégias de adaptabilidade e patogenicidade, exigem por parte dos pesquisadores o desenvolvimento de técnicas diferenciadas, que têm como base o uso de marcadores moleculares (Schots et al., 1994).

Esses marcadores podem ser usados para avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas, para identificar raças e patótipos.

Em alguns casos, o RNAds (RNA de dupla fita), tem sido usado como um marcador molecular para elucidar relações entre diferentes isolados fúngicos. Alguns aspectos importantes desse marcador são certa estabilidade e a fácil purificação. Sete isolados de *C. gloeosporioides*, infectando *Stylosanthes* spp., na Austrália foram avaliados por essa técnica, detectando-se dois grupos distintos de isolados. Como esse RNAds pode ser transmitido facilmente entre esses dois isolados, ainda foi possível se inferir sobre a ocorrência de anastomose entre os isolados (Manners et al., 1992).

Para algumas espécies de fungos, a análise de DNA mitocondrial tem possibilitado a identificação de considerável variação entre isolados, no entanto em alguns casos apenas possibilita diferenciação entre espécies (Bruns et al., 1998). Ainda possibilitou a separação de *Phytophthora* spp. de acordo com a origem geográfica e planta hospedeira (Föster & Coffrey, 1990) e ainda possibilitou a identificação de espécies de *Aspergillus* spp. e *Sclerotinia* spp. (Kohn et al., 1988; Kozlowski & Stepien, 1982).

Outra técnica que tem sido utilizada é a de RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphisms” que se baseia nas diferenças na seqüência primária do DNA nos sítios de clivagem específicos das enzimas de restrição (Carder &

Bárbara, 1991; Kessler, 1987; Michelmore & Hulbert, 1987). Tais diferenças causam variações nos tamanhos dos fragmentos que são produzidos por tratamento do DNA com enzimas de restrição. Este tipo de técnica é útil quando o DNA é isolado de partes específicas da célula, como o DNA mitocondrial. Entretanto, quando se utiliza o DNA como um todo, como na maioria dos casos, o uso de sondas (fragmentos marcados de DNA) é essencial para visualização de polimorfismo. A hibridação com sondas de DNA genômico, digerido por enzimas de restrição, é chamada hibridização Southern (Southern, 1975). Nessa técnica, todos os fragmentos de DNA presentes em um gel são desnaturados em uma solução básica e transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose (Southern Blot). A membrana é incubada com uma sonda previamente marcada e desnaturada sendo que, em condições de estringência, a sonda se liga somente aos fragmentos, para os quais, a mesma mostra homologia. As sondas podem ser derivadas de regiões repetitivas do genoma da espécie em questão, que são altamente variáveis (microssatélites), ou de alguma espécie taxonômica relacionada (nesse caso, a análise é chamada "DNA fingerprint"). Pode ser também derivada de genes funcionais, do DNA ribossomal, DNA mitocondrial, ou fragmentos aleatórios de uma biblioteca genômica. A similaridade entre as espécies de isolados analisados é medida pelo número de bandas que elas têm em comum. Um dos primeiros exemplos do uso de RFLPs para a caracterização de fungos é o trabalho de Manicon e colaboradores (1987), que diferenciou espécies e forma especiais de *Fusarium*.

RFLPs de DNA mitocondrial corresponderam diretamente à forma especiais de *Fusarium oxysporum* (Kistler et al., 1987) e ainda permitiram a identificação de uma linhagem *Pythium ultimum* (Martin, 1989), bem como a diferenciação dos tipos agressivos dos não-agressivos de *Ophiostoma ulmi* (Hintz et al., 1991).

O termo “DNA fingerprint” tradicionalmente se refere à obtenção de padrões únicos de RFLPs pelo uso de sondas que se ligam a regiões repetitivas do genoma, que são em geral, altamente variáveis (Charlesworth et al., 1994). Jeffreys e colaboradores (1987) usaram o termo “DNA fingerprint” para descrever os perfis de RFLP únicos que foram obtidos para cada indivíduo/espécie, utilizando sondas capazes de se ligarem a minissatélites. Observou-se que essa técnica é mais sensível do que as mais tradicionais, a exemplo das isoenzimas ou compatibilidade de heterocarions (Descenzo & Harrington, 1994). “DNA fingerprint” tem sido usado para caracterizar ou resolver problemas taxonômicos em vários fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzanium* e *Penicillium* spp. (Kusters-van Somere et al., 1991; Meyer et al, 1991). Fragmentos de biblioteca genômica de *Rhizoctonia solani* que se ligaram a regiões repetitivas distinguiram grupos de anastomose nessa espécie. Anteriormente, a utilização dessas técnicas para a identificação de grupos de anastomose era muito demorada (Balali et al., 1996).

Clones de uma biblioteca genômica foram isolados com uma sonda para estudar a diversidade genética de isolados australianos de míldio da uva, *Uncinula necator*. Essas sondas diferenciaram grande parte dos isolados classificando-os em dois grupos originados de introduções na Austrália (Evans et al., 1997).

Análises de RFLPs de seqüências conservadas do DNA ribossomal têm sido utilizadas para estudar relações filogenéticas entre organismos distantes e eventos evolucionários antigos. Por ser constituído por regiões que envolvem velocidades diferentes de evolução, essas regiões são consideradas como um conjunto de cronômetros cada uma oferecendo diferentes perspectivas da história evolucionária de um organismo (Woese, 1987).

Espécies do gênero *Pleurotus* foram analisadas por meio de RFLP utilizando DNA ribossomal como sonda, resultados foram obtidos que

confirmam a descrição morfológica (Iraçabal et al., 1995). No entanto, para o gênero *Verticillium*, a classificação baseada na morfologia com as espécies *V. chlamydosporium* e *V. suchlasporum*, não foi confirmada por RFLPs, quando se utilizaram as sondas de DNA ribossomal e sondas aleatoriamente isoladas de uma biblioteca genômica, a qual classificou os isolados como pertencentes a uma espécie (Carder et al., 1993). Em estudo semelhante Okoli et al., (1993) usando isolados de *V. dahliae* separou pelo uso dessa técnica patótipos adaptados a diferentes hospedeiros.

A principal indicação do uso de RFLPs nos estudos de fungos é baseada no fato de serem esses marcadores multialélicos, constantes em qualquer fase do desenvolvimento, co-dominantes e fenotipicamente neutros.

Por outro lado, cita-se como desvantagem dessa técnica para a identificação de isolados fúngicos, o requerimento de grande quantidade de DNA para visualização no gel dos padrões de bandas, e DNA de alta qualidade, isto é, intacto e sem inibidores das enzimas de restrição.

A técnica RAPD-PCR foi descrita por Williams e colaboradores (1990), e envolve o uso de seqüências iniciadoras (primers) de dez bases. Esse é o método de "PCR fingerprint" mais amplamente utilizado na identificação e caracterização de fungos, provavelmente por ser o mais barato. Os exemplos encontrados na literatura de identificação e caracterização de fungos são inúmeros. Em *Fusarium graminearum*, essa técnica tem sido útil por ser uma técnica alternativa na caracterização de patótipos e forma especiais, que é cara e demorada quando realizada por características morfológicas (Miller et al., 1991).

Por meio do uso da técnica RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente) foi detectada alta diversidade genética em alguns grupos de *Dreschlera* sp. e baixa em outros. A variabilidade detectada parece estar relacionada à pressão de seleção pelo cultivo de uma mesma cultivar em diferentes áreas (Kammiovirta et al., 1995).

Weir e colaboradores (1998) usaram a técnica RAPD para avaliar confrontar 35 isolados de *Alternaria solani*, obtidos de cultivares de tomate e batata, com *A. alternata*, um patógeno oportunista. Uma das seqüências iniciadoras utilizadas detectou polimorfismo suficiente para permitir a diferenciação entre as duas espécies de fungos.

Essa técnica também foi empregada para determinar compatibilidade sexual de vários grupos de *Fusarium*, obtidos de milho, arroz e sorgo. Foram encontrados 3 grupos de compatibilidade. Além de essa técnica ser promissora para esse tipo de estudo, ela também permitiu avaliar a variabilidade dentro de isolados em diferentes hospedeiros (Amoah et al., 1996).

A técnica AP-PCR foi descrita por Welsh & McClelland (1990), que, apesar de ser análoga ao RAPD-PCR, utiliza primers mais longos (de 20 a 34 nucleotídeos) sob condições de alta estringência. Além disso, os produtos de PCR são marcados radioativamente, separados em poliacrilamida e visualizados por autoradiografia. Essa técnica ainda apresenta a alternativa de empregar combinação de diferentes primers, o que possibilita um aumento no polimorfismo (Welsh & McClelland, 1991).

Freeman e Rodrigues (1995) empregaram essa técnica para agrupar 39 isolados de *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*. O agrupamento desses isolados em espécies, por essa técnica, correspondeu àqueles por classificação morfológica.

A reação de polimerase em cadeia usando elementos repetitivos para gerar “fingerprint” é outra técnica que tem sido empregada para análise de população de patógenos. Essa técnica combina a simplicidade da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) com o polimorfismo detectado por fragmentos de restrição (RFLP). Graças à natureza conservada dessas seqüências, elas podem ser amplificadas em diferentes organismos, incluindo fungos, e mostram diferentes graus de polimorfismo para diferentes genomas. Numerosas

seqüências repetidas de DNA têm sido identificadas e clonadas para o genoma do fungo *Magnaporthe grisea*, cuja forma anamorfa é *Pyricularia grisea*. Em estudo realizado com isolados desse fungo, o rep-PCR se mostrou extremamente útil em diferenciar isolados que infectam arroz daqueles que infectam outros hospedeiros, promovendo um eficiente meio de monitorar a dinâmica das populações desses isolados (George et al., 1998).

A presença de seqüências conservadas de DNAr (as subunidades 16-18S, 5,8S e 25S), permitem que primers de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) sejam desenhados e utilizados para uma ampla variedade de espécies fúngicas. Esses são chamados primers universais (White et al., 1990). Essas regiões conservadas flanqueiam as regiões variáveis, as chamadas ITS (“Internal Transcribed Spacers”- Unidade Transcricional) e IGS (“Intergen Spacer”- Região Espaçadora). Desta maneira, primers podem ser relacionados de forma a amplificar a região desejada.

Essa técnica proporcionou avanços em estudos taxonômicos, por oferecer meios mais rápidos, e específicos para a identificação e caracterização de fungos. O PCR também pode ser utilizado para DNA fingerprint, mostrando padrões únicos para cada espécie ou isolado (Caetano-Anollés et al., 1991; Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Além disso, essa técnica pode ser empregada para amplificar regiões, como a de genes que codificam RNA ribossomal, genes de DNA mitocondrial, genes de RNA transportador, microssatélite e outros genes funcionais para a detecção específica (Leal-Bertioli, 1998).

Microssatélites são seqüências curtas e repetidas (2 a 4 nucleotídeos) presentes em regiões aleatórias no genoma de todo o organismo eucarioto (Beckmann & Weber, 1992). A região pode variar, assim como o número de repetições presentes em cada organismo (Wu & Tanksley, 1993). Portanto, marcadores moleculares baseados em microssatélites podem ser obtidos para a

discriminação de táxons. Esse método já foi testado em vários fungos e identificou polimorfismo inter e intraespecífico nos patógenos. A Utilização dessa técnica tem auxiliado na identificação e caracterização de fungos, mas apresenta a desvantagem de necessitar o conhecimento prévio das seqüências de DNA do organismo a ser estudado para a construção dos primers.

A caracterização de DNA usando oligonucleotídeos tais como  $(GATA)_4$ ,  $(GTG)_5$ ,  $(CA)_8$  e  $(TCC)_5$  tem sido relatada para detectar a variação entre isolados de *Aschochyta rabiei* (Weising et al., 1994). No caso de fungos filamentosos tais como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, sondas como  $(GATA)_4$  juntamente com sondas  $M_{13}$  de minissatélites têm revelado padrões informativos de caracterização (Meyer et al., 1991). Sondas de minissatélites humanos têm sido empregadas com sucesso para distinguir patótipos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Braithwaite & Maners, 1999).

O desenvolvimento das Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) para “fingerprint” usando minissatélites e microssatélites como primers têm provado serem úteis na detecção da variação genética (Meyer et al., 1991). A reação em cadeia baseada em elementos repetidos gera “fingerprint” por amplificação de seqüências entre cópias aleatoriamente dispersas do elemento no genoma. Essa técnica combina a simplicidade do PCR com o polimorfismo detectado pelo RFLP e tem sido usada para “fingerprint” de bactérias e fungos. Por causa da natureza conservada dessas seqüências, elas têm sido úteis em outros estudos empregando outros microrganismos. Numerosas seqüências desse DNA repetido têm sido identificadas e clonadas do genoma de fungos do arroz, como o *Magnaporthe grisea* (anamorfo=*Pyricularia*). Entre esses, o elemento *MGR 586* tem sido o mais extensivamente usado para caracterizar populações. O *pot<sub>2</sub>*, é outro elemento repetido isolado de *M. grisea*. O elemento *pot<sub>2</sub>* representa um dos maiores DNAs repetitivos de *M. grisea* que infecta o arroz e outros hospedeiros. Em contraste *MGR 586* está presente em 45 a 50 cópias por

genoma no patógeno do arroz, e em apenas 1 ou 3 cópias por genoma nos patógenos de outras gramíneas. Amostras de DNA de isolados de *Magnaporthe grisea* foram caracterizadas pelo uso de Reação de Polimerase em Cadeia usando elementos repetitivos com duas seqüências do primer do gene *Pot<sub>2</sub>*, encontrado em aproximadamente 100 cópias no genoma do fungo. Este estudo demonstrou a utilidade dessa técnica para diferenciar isolados que infectam outros hospedeiros. O “fingerprint” de DNA pelo gene *Pot<sub>2</sub>* promoveu um eficiente meio de monitorar a dinâmica da população em uma dada região (George et al., 1998).

A variação patogênica entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* foi analisada empregando testes de patogenicidade e a variação genética pelo uso de DNA “fingerprint” dos elementos repetitivos FOLR1 e FOL4. Nessa pesquisa, esses marcadores não foram eficientes para distinguir variantes patogênicos dentro das raças, mas promoveram uma base para avaliação da evolução da especialização patogênica em *F. oxysporum*, e os impactos geográficos com o isolamento ao fluxo gênico e a co-evolução desses microrganismos com outros hospedeiros (Namiki et al., 1998).

Outro método, que tem sido utilizado e que apresenta algumas vantagens sobre o RAPD, é o AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Nele o DNA é cortado com enzimas de restrição, e moléculas adaptadoras são então ligadas aos fragmentos de restrição gerados. Esse evento é catalisado por uma enzima denominada T4 ligase. Uma amplificação via PCR é carreada usando primers que são homólogos ao adaptador, no sítio de restrição. Os fragmentos de DNA são então separados em gel de seqüenciamento e aproximadamente 50 a 100 bandas são obtidas. A principal vantagem do AFLP sobre o RAPD é que muitos fragmentos são gerados e conseqüentemente mais bandas podem ser detectadas com uma simples amplificação.

A técnica de AFLP é uma em um número de procedimentos de DNA “fingerprinting” que tem vantagens sobre a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Vos et al., 1995). Uma vez que a técnica de AFLP pode ser aplicada a uma ampla variedade de organismos (e fontes virais) sem a necessidade de conhecimento prévio das seqüências que compõem o DNA, e essa técnica tem se tornado uma ferramenta universal para a análise de DNA.

A técnica de AFLP foi empregada no estudo de caracterização de 73 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* obtidos de regiões na Califórnia, Índia, Espanha e Chipre, usando 3 diferentes combinações de primers. Pela análise de agrupamento, empregando-se bandas polimórficas detectou-se 3 grupos distintos. A técnica de AFLP apresentou-se como um método rápido e eficiente para diferenciar isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, dos de outras formas especiais, bem como de outros patógenos como *Ascochyta rabiei*, *Fusarium eumartii* e *F. solani* (Kelly et al., in C. Schader & J. Wostemeyer, 1994).

Essa técnica também foi empregada para acessar os níveis de variação entre espécies e isolados do gênero *Colletotrichum*. Nesse estudo os autores (O'Neill et al., 1997) caracterizaram os patógenos de alfafa em dois níveis dentro do complexo *Colletotrichum*. Essa caracterização, que até então era feita por marcadores morfológicos, os quais falharam para identificar esses isolados, foi coerente com a patogenicidade.

O microrganismo *Eutypa armeniacae* ou *E. lata*, que é patogênico à uva no mundo, também foi investigado usando marcadores de AFLP. A classificação taxonômica para esse gênero não tem sido claramente distinta para espécies. O estudo de 115 isolados de *Eutypa*, por AFLP e análise de seqüência de DNA ribossomal da ITS, revelou serem os isolados obtidos de *Quercus lobata* distintos daqueles que atacam uvas. A análise das seqüências de ITS de DNA ribossomal reforçou o agrupamento obtido pelos dados de AFLP. Ainda se pode

observar uma habilidade das espécies desses patógenos em infectar hospedeiros nativos e cultivados, mostrando o potencial das espécies nativas de servirem como fonte de inóculo para novas fontes de infecção. Essas informações foram valiosas na escolha de estratégias de manejo e controle da doença (Descenzo & Harrington, 1994).

Dessa forma a técnica de AFLP tem se mostrado promissora para estudos da mais diversa natureza para diferentes organismos, a exemplo da análise da diversidade genética, caracterização taxonômica de isolados fúngicos que atacam plantas, dentre outros. Apesar de não ser uma técnica muito barata, quando comparada com o RAPD, pode-se obter um elevado polimorfismo o que compensa sua utilização.

### **3. Caracterização de cultivares**

A necessidade de caracterização de cultivares tem crescido, principalmente com a promulgação da lei de proteção e registro de materiais melhorados.

No Brasil, a Lei de Proteção de Cultivares de nº 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de materiais genéticos (BRASIL, 1997)

Tradicionalmente, têm sido empregados descritores morfológicos para registro e lançamento de novas cultivares. Esses marcadores morfológicos, apesar de seu uso geral e sua importância, apresentam limitações, que contribuem cada vez mais para a busca de técnicas alternativas para a caracterização de cultivares e para a certificação da pureza genética. Nesse sentido, os marcadores moleculares, têm cada vez mais despertado interesse e têm sido pesquisados. Esses têm sido empregados principalmente quando os marcadores morfológicos falham para os caracteres de distinguibilidade,

estabilidade e homogeneidade, mas vale lembrar que ainda não constam como descritores na Lei de Proteção de Cultivares.

Podem-se citar basicamente três tipos de marcadores sugeridos para a caracterização de cultivares e para a certificação da pureza genética, os morfológicos, os bioquímicos (proteínas e enzimas) e os de DNA.

Os descritores morfológicos têm tido um papel fundamental na divulgação das características agrônômicas de novos materiais. Com relação aos aspectos de distinguibilidade exigidos pela lei de proteção de cultivares, contudo, os descritores morfológicos apresentam limitações, quando se emprega genótipo estreitamente relacionado, pois algumas vezes falham na distinção (Smith & Smith, 1992).

As cultivares modernas têm cada vez mais agregado valor em virtude do emprego de tecnologia para obtenção de cultivares que carregam características agrônômicas desejáveis, e que são o somatório do trabalho conjunto de vários profissionais. As sementes dessas cultivares se tornam bens agregados, que exigem cada vez mais a sua proteção pelas empresas, na tentativa de garantir o retorno do trabalho conjunto de pesquisadores, bem como a utilização de alta tecnologia.

Os marcadores moleculares, que reúnem os marcadores bioquímicos e de DNA, têm sido sugeridos para a caracterização de cultivares e também para a certificação da pureza genética em lotes de sementes, visando essa proteção. Nesse sentido a ISTA (International Seed Testing Association, 1996) e a AOSA (Association of Seed Analysis, 1991), têm indicado vários tipos de proteínas de armazenamento para a caracterização de cultivares.

Dentre essas, as hordeínas em cevada, as secalinas em centeio, glutelinas em trigo, aveninas em aveia, zeínas em milho, lectinas e vicilinas em *Phaseolus*; legumininas em *Pisum sativum*, glicina em soja (Kiegel & Galili, 1995). Sendo um produto direto da expressão de genes, elas exibem um considerável

polimorfismo que se baseia na premissa básica de que esses produtos apresentam diferenças na mobilidade por serem codificados por diferentes seqüências de nucleotídeos no DNA. Assim, as diferenças nos perfis eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy et al., 1990).

As técnicas de eletroforese baseada nesses marcadores permitem a diferenciação de cultivares de determinadas espécies (Vieira, 2000; Salgado, 2001). No entanto, esses marcadores podem se apresentar variáveis dependendo do tecido analisado, da ocorrência de microrganismos em associação com esses tecidos, da adubação e das condições ambientais (Silva, 1997; Pierce & Brewbaker, 1973; Imolesi, 1999).

Tem sido descrito um grupo de proteínas robustas, hidrofílicas, que são extraídas em condições de altas temperaturas com água, e que se armazenam nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes. Essas proteínas não têm nenhuma atividade catalítica aparente, mas sua natureza conservada, propriedades físicas e sua abundância sustentam um papel de tolerância à dessecação (Kiegel & Galili, 1995).

Essa natureza conservada dessas proteínas as coloca como marcadores promissores na identificação e certificação de cultivares.

Os marcadores moleculares de DNA têm sido amplamente pesquisados para esse fim, pois superam limitações dos marcadores bioquímicos como o baixo polimorfismo, principalmente em genótipos de base genética estreita, e serem influenciados por condições ambientais. Esses marcadores podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada: hibridização ou amplificação (Milach, 1998). Entre os que utilizam hibridização estão os marcadores RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e Minissatélites ou locos VNTR (Número Variável de Seqüências Repetidas em Tandem) e como os classificados por amplificação, os do tipo RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso); AFLP (Polimorfismo de

Comprimento de Fragmentos Amplificados); SCAR (Regiões Amplificadas Caracterizadas por Seqüência); STS (Sítios Marcados por Seqüências); Microsatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas) e ISSR (Regiões Entre Simples Seqüências Repetidas).

Os marcadores RFLP foram os primeiros marcadores a serem utilizados em estudos sobre a divergência genética, estrutura do genoma, relações evolutivas e identificação de cultivares e mapas genéticos. Nesse sentido, O'Donoghue e colaboradores (1994) utilizando 18 sondas de RFLP, conseguiram distinguir 83 cultivares de aveia. Para cultivares de soja, os marcadores RFLP e RAPD, permitiram a distinção de 10 cultivares (Prabhu et al., 1997)

Mackill (1995), afirma que a técnica de RAPD é útil na determinação da diversidade genética. Estudando 134 amostras de cultivares de arroz, o autor conseguiu separar os genótipos estudados em arroz *indica* ou em *japonica*, pela análise de agrupamento, e ainda observou pequena divergência genética dentro de *japonica*. Já Ko e colaboradores (1994), determinaram relações genéticas entre 37 cultivares de arroz de diferentes centros geográficos, pela técnica de RAPD, utilizando 22 primers e 144 marcadores e obtiveram similaridade variando entre 72 e 96 %.

Marcadores RAPD, proteínas e isoenzimas também foram empregados para cessar a similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca, o que resultou em dados que demonstraram a base genética estreita dos materiais estudados (Vieira, 2000).

RAPDs permitiram a caracterização de cultivares de *Gossypium hirsutum* e uma cultivar de *G. barbadense* sob cultivo na Austrália. Num total de 453 marcadores RAPD obtidos, 69 estavam presentes em uma cultivar de *G. barbadense*, a cultivar Pima S-7. Foi verificado ainda, 98,9 % de similaridade entre cultivares relacionadas geneticamente (Multani & Lyon, 1995).

A técnica de AFLP (Zabeau, 1993), também tem sido utilizada em estudos que envolvem a caracterização e diferenciação de cultivares. Essa técnica envolve quatro etapas que incluem a digestão do DNA com enzimas de restrição, uma de corte raro (*Eco RI*) e outra de corte freqüente (*MseI*) e ligação de adaptadores específicos e amplificação seletiva de fragmentos com primers específicos e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida. O polimorfismo obtido por AFLP é baseado em diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos. Assim, possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso na caracterização de cultivares.

Cervera e colaboradores (1998) detectaram pela técnica de AFLP diferentes clones de uma determinada cultivar de videira. Duas combinações de primers foram utilizadas, as quais permitiram a obtenção de um total de 116 e 104 bandas, para cada combinação de primer com 64 e 44 bandas polimórficas, respectivamente.

Também cultivares de maçã foram identificadas pelo uso de marcadores AFLP. Seis combinações de primers foram usadas nas amplificações seletivas, em que duas combinações de primers permitiram a identificação de 28 cultivares de maçã (Tignon et al., 2000).

A técnica de AFLP também possibilitou distinguir claramente quatro grupos principais de azeitona de acordo com a origem geográfica, apesar de tradicionalmente serem empregados caracteres de morfologia e fenologia para a identificação de cultivares verde-oliva. Com base nos resultados de dados de AFLP foi possível distinguir claramente quatro grupos principais de acordo com a origem geográfica das cultivares (Gallitelli et al., 2001).

A crescente necessidade de caracterizar uma dada cultivar ou híbrido de acordo com DNA tem tornado essas técnicas, ferramentas importantes no patenteamento de plantas melhoradas nos países onde existem leis

regulamentando a proteção desses materiais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, o “fingerprinting” por meio de marcadores moleculares tem sido importante em processos legais que envolvem disputas de direito autoral (Smith, 1989) e tem sido o instrumental considerado como suporte ao contínuo investimento em melhoramento de plantas por empresas produtoras de sementes híbridas (Smith & Chin, 1992; Jondle, 1992). Vale ainda ressaltar que para tais marcadores possam contribuir para esses fins, eles devem apresentar características de variação inter-varietal distintiva; mínima variação intra varietal; estabilidade ambiental e reprodutibilidade experimental (Bailey, 1983).

O Gênero *Gossypium* é constituído de 52 espécies, sendo que dessas, quatro são cultivadas. As espécies cultivadas *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. são diplóides ( $2n=2x=26$ ) e nativas do Velho Mundo. As espécies cultivadas *Gossypium hirsutum* L. e *Gossypium barbadense* L. são alotetraplóides ( $2n=4x=52$ ) e nativas do Novo Mundo. O *Gossypium hirsutum* L. contribui com a maioria da fibra produzida mundialmente (90%) e o *Gossypium barbadense* L. com 8% (Beltrão, 1999).

A cultura do algodão é uma das principais do mundo, tendo uma área cultivada em mais de 80 países nos dois hemisférios, superior a 33,5 milhões de hectares, para uma produção de cerca de 19,16 milhões de toneladas de pluma por ano, consumo de 19,27 milhões de toneladas (Bieh & Zandonadi, 1998).

No Brasil, os programas de melhoramento têm utilizado genótipos obtidos de materiais como Tamcot SP-37, Auburn 56 e GH-11-9-75, o que confere pouca divergência (Beltrão, 1999).

Descritores têm sido sugeridos para a certificação e proteção de cultivares de algodoeiro, os quais se baseiam em critérios de morfologia e fisiologia (BRASIL, 1997). Dentre esses pode-se citar a reação a doenças. Esse descritor tem sido trabalhado constantemente para a obtenção de genótipos que

apresentem certo grau de resistência (Cia et al., 1999; Freire et al., 1997; Carvalho et al., 1988).

Os marcadores moleculares podem ser definidos como um fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como as isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, que podem ser expressas ou não (Ferreira & Grattapaglia, 1998). No algodão os marcadores moleculares têm auxiliado na compreensão de relações filogenéticas, na seleção assistida por marcadores, pela identificação de regiões específicas nos cromossomas responsáveis por características agrônômicas e de qualidade de fibra (Beltrão, 1999). Esses marcadores não têm sido indicados pela Lei de Proteção de Cultivares, mas estudos demonstram a sua utilidade para esse propósito. No entanto, para que isto ocorra, muitos estudos têm que ser realizados principalmente quando se considera o custo para realização de técnicas empregando marcadores moleculares.

As isoenzimas como marcadores em algodoeiro foram empregadas para acessar o fenótipo eletroforético das enzimas Fosfoglucomutase em gerações  $F_2$  obtidas de cruzamentos entre *Gossypium herbaceum* e *G. arboreum*, nos quais foi possível identificar os genótipos homozigotos dos heterozigotos pelo padrão de bandas (Suiter, 1988). No entanto, para fins de proteção, esses se mostram pouco informativos. Uma alternativa é a utilização de marcadores moleculares de DNA.

A análise da variação de isoenzimas em algumas espécies dentro do gênero *Gossypium* tem mostrado o grande número de isoenzimas presentes para muitos locos, devido ao caráter poliplóide das espécies representadas principalmente por *Gossypium hirsutum*. Essa variação tem sido útil como marcadores, em estudos evolutivos para esclarecimento da origem das espécies. Essa variação tem sido observada mesmo dentro de linhagens altamente

endogâmicas, demonstrando sua utilidade como ferramentas na diferenciação de cultivares (Suiter, 1988).

A dificuldade na purificação do DNA genômico de alto peso molecular tem afetado o progresso na identificação de marcadores e, conseqüentemente, no desenvolvimento de mapas genômicos e na construção de livrarias genômicas, para o gênero *Gossypium*. No entanto, quando se supera essa dificuldade, a utilização de marcadores tem sido útil para a avaliação da diversidade genética.

Marcadores moleculares de DNA tipo RAPD foram empregados em genótipos de parentais e linhagens monossômicas derivadas do cruzamento entre *G. hirsutum* e *G. barbadense*, os quais auxiliaram na construção de mapas citológicos pela identificação das linhas monossômicas (Lazo et al., 1994)

Usando RAPDs, Pendse e colaboradores (2001) avaliaram a eficiência dessa técnica para identificar materiais de *G. hirsutum* usando sementes. A utilização de 160 primers permitiu a identificação de híbridos e linhagens, os quais coincidiram com os testes de pureza genética por meio de marcadores morfológicos no campo. No entanto, convém comentar que sob aspectos práticos, a utilização de um grande número de primers amplia o tempo e custo necessário para essa investigação, inviabilizando a utilização desse marcador para a avaliação da pureza genética.

Outro tipo de marcador empregado em algodoeiro é o de DNA tipo RFLP. Esse marcador, quando empregado por Meredith Junior (1992), em 24 cultivares de algodoeiro, possibilitou a estimativa de valores de heterozigosidade e diversidade genética.

Dados de isoenzimas e marcadores RFLP em algodoeiro foram úteis na identificação de centros de diversidade genética sendo um na Meso-América e outro no Caribe, e ainda promoveram informações para que pudesse se inferir sobre a base genética estreita das cultivares modernas, as chamadas Upland (Wendel et al., 1992).

Os marcadores RAPD e RFLP estão sendo empregados em estudos de QTL (locos para características quantitativas), relacionados às características de interesse econômico no melhoramento, principalmente características tecnológicas de fibra (Wang et al., 1993; Park & Kohel, 1993; Lazo et al., 1994).

Os marcadores moleculares também têm permitido a construção de mapas saturados dos cromossomas de algodoeiro, cuja importância se amplia uma vez que esses podem identificar não só as regiões do genoma na localização de QTLs, como ainda outras regiões do genoma relacionadas com a resistência a pragas e doenças, bem como outras características de interesse agrônomico (Percy & Wendel, 1990; Stelly, 1993; Shapley et al., 1993; Reinisch et al., 1994; Yu et al., 1996).

#### **4. Interação entre patógenos e plantas**

✱ Um dos aspectos mais importantes para o sucesso da lavoura algodoeira é o controle de doenças. Os valores percentuais de perdas causadas por fitopatógenos variam de região para região dependendo das condições climáticas e do nível tecnológico empregado na cultura. As perdas na produção estimadas para a maior região produtora, a região Centro-Oeste, têm sido estimadas em valores de aproximadamente 13 % (Freire et al., 1999), demonstrando a importância de estudos nessa área. O desenvolvimento de cultivares de algodoeiro resistentes às principais doenças tem reduzido substancialmente as perdas causadas por vários patógenos (Watkins, 1981). Nesse sentido, o uso de cultivares resistentes é uma das medidas mais eficientes de controle de doenças.

Trabalhos têm sido conduzidos visando à obtenção de cultivares que apresentem resistência, apresentando vantagens como a facilidade de utilização e o baixo custo para o agricultor, pela redução na utilização de defensivos químicos, e conseqüente redução da poluição ambiental ocasionada pela

lixiviação dos resíduos desses produtos. No entanto, a identificação de genótipos resistentes, muitas vezes é difícil, principalmente pelo desconhecimento da relação patógeno/hospedeiro e do tipo de controle genético da reação do hospedeiro.

A reação a doenças como fusariose e antracnose no algodoeiro têm sido indicadas como um descritor para registro e proteção de cultivares (BRASIL, 1997). No entanto, informações sobre as interações entre os patógenos que causam essas doenças e a interação desses com plantas de algodoeiro não tem sido relatada. Outro aspecto é que a resistência tem sido testada para cultivares empregando na maioria das vezes um ou poucos isolados de patógenos, os quais nem sempre representam a variabilidade de patógenos em uma dada região. Dessa forma pode-se indicar uma cultivar como sendo resistente a uma doença e, quando essa cultivar é testada para outros patógenos, essa resistência nem sempre é verificada. Em função disso, as relações entre patógenos e hospedeiros, são de extrema importância na indicação dessa característica como um descritor para registro e proteção de cultivares. ✖

#### **4.1 Respostas à interação entre patógenos e hospedeiros**

As relações entre patógenos e hospedeiros são uma resposta à interação de genes de virulência do patógeno e de resistência na planta, e é fundamental para a definição de estratégias de melhoramento de plantas visando à resistência a fitopatógenos.

Um dos aspectos importantes dessa interação é a herança da resistência genética de plantas a patógenos, que pode ser definida como monogênica ou poligênica, tendo como base no número de genes envolvidos na expressão desse caráter. Em termos práticos, para a resistência monogênica não existem níveis intermediários de severidade de doença, ocorrendo uma distribuição fenotípica

descontínua; enquanto na resistência poligênica existem níveis intermediários de resistência, ocorrendo uma variação contínua nos níveis de severidade de doença.

A resistência também pode ser classificada de acordo com a reação a raças do patógeno, nos quais na resistência vertical existe interação entre raças do patógeno e cultivares do hospedeiro e, portanto a resistência das cultivares varia dependendo da raça que se usa para avaliação da resistência.

Na resistência horizontal não existe interação entre raças e cultivares, sendo a classificação das cultivares quanto à resistência a mesma com qualquer raça. É comum se verificar a ocorrência de resistência monogênica com vertical e resistência poligênica com horizontal, no entanto essa afirmativa nem sempre é regra.

Maior desafio tem sido obtido na obtenção da resistência horizontal, que na maioria das vezes é a preferida pelos melhoristas de plantas e fitopatologistas, por ser mais duradoura e estável. Assim, mesmo que a cultivar com resistência horizontal apresente um certo nível de suscetibilidade, poderá ser utilizada com sucesso graças a maior vida útil desse nível de resistência.

Existe uma grande polêmica sobre o controle genético da resistência poligênica. Uma das hipóteses é de controle genético diferenciado para resistência monogênica (gene-a-gene) e poligênica (aditivo), e outra de controle genético integrado para os dois tipos de resistência. O modelo proposto por Parlevliet & Zadoks (1977) sugere que a resistência poligênica é controlada por vários genes com efeitos diferentes. Os autores acreditam que a teoria gene-a-gene deve ser estendida para a resistência poligênica independente dos efeitos maiores e menores dos genes.

A interação gene-a-gene é conhecida em vários casos para a resistência monogênica. No entanto, com poligenes não existem muitas evidências experimentais da ocorrência da interação gene-a-gene.



Para se avaliar a resistência são realizados testes de patogenicidade, que num sentido amplo sugerem a capacidade infecciosa de um patógeno, incluindo a agressividade e virulência. A agressividade é utilizada como sendo a capacidade horizontal de infecção, é a média de danos causados por uma raça em todos os hospedeiros inoculados. A virulência é definida como a capacidade vertical de infecção, é o dano causado por uma raça em um hospedeiro específico. Dessa forma, as resistências horizontal e vertical são definidas como a capacidade do hospedeiro em tolerar a agressividade e virulência dos patógenos, ou seja, resistência inespecífica e específica.

O grau de resistência é definido pela estimacão da severidade de doença em cada hospedeiro, sendo a severidade de doença definida pela porcentagem de plantas atacadas e porcentagem de área vegetal danificada.

A resistência vertical monogênica é passível de ser vencida dentro da capacidade microevolutiva do patógeno. Isso significa que esse tipo de resistência tende a ser efêmero. Esse é um fato para o qual não faltam exemplos na literatura, dentre os quais a transitoriedade da eficiência dos genes *Dm* de alface contra *Bremia lactucae* (Crute, 1992), dos genes *R* de resistência a *Phytophthora* em batata (Vanderplank, 1968), dos monogenes de resistência a *Pyricularia oryzae* em arroz e dos monogenes *Are* de resistência à ferrugem e antracnose em feijoeiro (Beebe & Corrales, 1991). Também é geralmente aceita a idéia de que resistência horizontal poligênica está além da capacidade microevolutiva do patógeno em ser vencida. É o caso da cultivar Proctor de cevada, resistente ao fungo *Ustilago nuda*, que é uma resistência tipicamente poligênica horizontal, e possivelmente além da capacidade de mudança do patógeno.

A concepção da durabilidade das resistências vertical e horizontal não se originou baseada apenas em dados de campo. Existem considerações teóricas que levam ao aceite de que sistemas poligênicos de resistência possuem maior

“capacidade tampão” de resistir a mudanças genéticas no patógeno do que sistemas monogênicos. Essas argumentações assumem que tanto sistemas poligênicos como monogênicos seguem a hipótese gene-a-gene. Assim sendo, uma resistência poligênica será muito mais estável do que uma monogênica pois, para que surjam formas variantes do patógeno são requeridas mudanças genéticas em vários locos de patogenicidade, ao contrário do sistema monogênico, onde a mudança deve ocorrer em apenas um loco (Camargo & Bergamin Filho, 1995).

Resistências vertical monogênica e horizontal poligênica podem ocorrer em um mesmo genótipo. Nesse caso, de acordo com Parlevliet (1983), seleção de resistência horizontal na presença de vertical monogênica pode produzir efeito contrário ao desejado, resultando em frequências elevadas de genes de resistência vertical. Isso porque o efeito principal dos genes de resistência vertical pode fazer com que o efeito secundário dos poligenes não seja detectado. Na tentativa de solucionar esse problema, é comum a noção de que o uso de misturas de raças como inóculo reduz a variação devida à resistência vertical, possibilitando o reconhecimento de genes de resistência horizontal. Segundo Parlevliet (1983), esse procedimento é incorreto, pois quando cultivares contendo diferentes genes verticais são inoculadas com uma mistura de raças, estas podem diferir quanto ao número de raças na mistura a que são resistentes. Essa diferença pode ser interpretada, erroneamente, como resultante da presença de resistência horizontal poligênica. A cultivar que apresentar uma combinação de genes que seja efetiva contra o maior número de raças na mistura apresentará os menores níveis de severidade. O autor sugere que, nesses casos, uma raça com o espectro de virulência, o mais amplo possível, seja utilizada.

A resistência pode, também, ser classificada de acordo com sua efetividade contra raças do patógeno. Essa classificação, proposta por Vanderplank (1963), é muito interessante do ponto de vista prático, pois permite

prever as conseqüências dos tipos de resistência no progresso da doença fornecendo subsídios ao melhorista e ao fitopatologista na escolha das fontes de resistência que serão usadas em seus programas de melhoramento. Segundo o autor, existem resistências que são efetivas contra algumas raças do patógeno e resistências que o são contra todas as raças. No primeiro caso, temos a resistência vertical (também chamada de raça-específica), ao passo que no segundo temos as resistências horizontais, ou raça inespecífica. Quando uma série de diferentes raças de um patógeno é inoculado em uma série de diferentes cultivares de um hospedeiro pode-se ou não ter uma interação diferencial significativa. Na ausência de interação significativa, qualquer raça pode ser usada para classificar as cultivares, configurando-se assim a resistência horizontal, caso contrário teremos a resistência vertical. Existe alguma confusão na definição do tipo de resistência, sendo a resistência monogênica definida como vertical e a poligênica, como horizontal. Essa associação pode ser verdadeira em muitos casos, mas não em todos.

✧ Carvalho e colaboradores (1988), estudando à resistência para cultivares de algodoeiro evidenciaram que a resistência a ramulose é controlada por um par de genes, e a susceptibilidade parcialmente é dominante, com grau de dominância 0,95 e herdabilidade 0,51.

Alguns genótipos apresentando certa resistência a patógenos causadores de ramulose em algodoeiro, como o Auburn 56, CNPA ITA-90, Deltapine Acala 90 e CNPA ITA-90 , têm sido empregados em programas de melhoramento (Toffano, 1963; Freire et al., 1997). No entanto, quando avaliados para diferentes patógenos, alguns genótipos têm se mostrado susceptíveis, e experimentos ainda demonstram a instabilidade da maioria dos genótipos, com relação a patogenicidade (Cia et al., 1999).

O que se pode observar é que nos ensaios de avaliação de resistência a doenças, não existe a descrição dos patógenos utilizados nas pulverizações dos

inóculos, e ainda faltam descrições sobre local de origem dos genótipos dos patógenos e a avaliação da variabilidade desses microrganismos.

Para avaliação da resistência, deve-se considerar esta interação entre patógenos e hospedeiros. Análises que permitam inferir sobre o tipo de resistência envolvido, bem como o grau de agressividade dos patógenos, são importantes. Nesse sentido, tem sido sugerida uma metodologia por Melo e Santos (1999) que é uma modificação do esquema de dialelo parcial descrito originalmente para acessar a habilidade de combinação de parentais colocados em grupos distintos (Geraldini & Miranda Filho, 1988). Nessa modificação de metodologia, um grupo é formado por hospedeiros e outro pelos patógenos. Assim no dialelo parcial, a capacidade geral de combinação dos parentais no grupo I (CGCI), e no grupo II (CGCII) e a capacidade específica de combinação (CEC) são estimadas. Assim, tomando as interações hospedeiros e patógenos, a CGC I corresponde à CGR (Capacidade Geral de Reação), que permite inferir sobre a resistência horizontal genotípica, e que depende da performance média dos hospedeiros nas inoculações com os diferentes genótipos de patógenos (raças). Similarmente, a CGC II corresponde à CGA (Capacidade Geral de Agressividade) que representa a patogenicidade média para cada raça quando usada para inocular todos os genótipos de hospedeiros. A CEC corresponde à CEI (Capacidade Específica de Interação) indicando interação entre componentes dos dois grupos, que permite inferir sobre a resistência vertical e sobre o grau de virulência de raças dos patógenos.

Para que a característica reação à ramulose possa ser empregada como um descritor para registro e proteção de cultivares, as cultivares devem ser avaliadas quando em associação com os mais diversos isolados causadores de ramulose, obtidos de diferentes regiões, os quais devem ser descritos e sempre empregados nas avaliações para novas cultivares que venham a ser liberadas. Como os patógenos estão sujeitos à pressão de seleção, principalmente pelo uso

\*

contínuo de defensivos, como fungicidas, a quebra da resistência de uma dada cultivar deve ser descrita e o isolado incluído nos testes de patogenicidade em programas de melhoramento visando à resistência a doenças.

## 5 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 Biólogo**, 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 Biólogo**, 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, G. C.; MIMS, C. W. **Introductory micology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1962. 632 p.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1992. 242p.

AMOAH, B. K.; MACDONALD, V.; REZANOOR, N.; NICHOLSON, P. The use of random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseola*. **Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 115-125, Feb. 1996.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371p.

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

- BAILEY, D. C. Isozymic variation and plant breeders rights. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. pt. A, p.425-441.
- BALALI, G. R.; WHISSON, D. L.; SCOTT, E. S.; NEATE, S. M. DNA fingerprint probe specific to isolates of *Thizoctonia solani* AG-3. **Mycology Research**, Cambridge, v. 100, n. 4, p. 467-470, Apr. 1996.
- BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, San Diego, v. 12, n. 4, p. 627-631, Apr. 1992.
- BEEBE, S.E.; CORRALES, M.P. Breeding for disease resistance. In: Van SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. (Ed). **Common beans: research for improvement**. Wallingford: CAB Internacional, 1991. p. 561-617.
- BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Algodão/Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 1999. v. 1. 491p.
- BIEHL, H.; ZANDONADI, R. Implicações sócio-econômicas do abandono da cultura do algodão no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 7, n. 3, jul./set. 1998.
- BITANCOURT, A. A. A antracnose e as falhas no plantio de algodão. **O Biólogo**, São Paulo, v. 1, n. 11, p. 402-404, nov. 1935.
- BRAITHWAITE, K. S.; MANNERS, J. M. Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphism in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Current Genetics**, New York, v. 16, n.5/6, p. 473-475, Dec. 1989.
- BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de Proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 525-64, 1998.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESOFF, P. M. DNA amplification fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, New York, v. 9, n. 6, p. 553-557, June 1991.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. Piracicaba: Ceres, 1995. v. 1, p.729-760.

CARDER, J. H.; BARBARA, D. J. Molecular variation and restriction length Fragment polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. **Mycology Research**, Cambridge, v. 95, n. 8, p. 935-942, Aug. 1991.

CARDER, J. H.; SEGERS, R.; BUTT, T. M.; BARBARA, D. J.; VON MENDE, N.; COOSEMANS, J. Taxonomy of the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* based on secreted enzyme activities and RFLP analysis. **Journal of Invertebrated Pathology**, San Diego, v. 62, n. 2, p. 178-184, Sept. 1993.

CARVALHO, L. P. de; LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F. C. de; MOREIRA, J. de A. N. Herança da resistência à ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 10-15, mar. 1988.

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.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, R.; MARTINEZ DE TODA, F. MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study wity accessions from Rioja (Spain). **Theoretical Applied of Genetics**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 51-59, 1998.

CHARLESWORTH, B.; SNEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The volutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 215-220, Sept. 1994.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.

- CHITARRA, G. S. Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 3, n. 3, p. 167-193, maio/jul. 1977.
- CIA, E.; FUZATTO, M. G.; PIZZINATO, M. A.; PETTINELLI JR., A.; PAULO, E. M.; ZIMBACK, L.; SILVA, M. A.; BORTOLETTO, N.; VASCONCELOS, A. S. A. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2., 1999, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto, 1999. p.441-443.
- COSTA, A. S.; FRAGA JUNIOR, C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 12, n. 5/7, p. 249-252, maio/jul. 1937.
- 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.
- CROUS, P. W.; JANSE, J. H.; VICTOR, D.; MARAIS, G. F.; ALFENAS, . C. Characterization of some *Cylindrocladium* species with three-septate conidia using morphology, isozyme banding patterns and DNA polymorphisms. *Systematic Applied Microbiology*, Jena, v. 16, n. 2, p. 266- 273, July 1993.
- CRUTE, I.R. From breeding to cloning: A case study with lettruce downy mildew. *Annual Review of Phytopathology*, St. Paul, v. 30, p. 485-506, 1992.
- DESCENZO, R. A.; HARRINGTON, T. C. Use of (CAT)5 as a DNA fingerprint probe for fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, n. 5, p.534-540, May 1994.
- DRUMOND, O. A. A ramulose em Minas Gerais. *Boletim de Agricultura*, Belo Horizonte, v. 10, n. 3/12, p. 95-97, 1961.

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

EL-GHOLL, N. E.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W.; SCHUBERT, T. S. Description and pathogenicity of *Cylindrocladium ovatum* sp. nov. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 466-470, Mar. 1993.

EVANS, K. J.; WHISSON, D. L.; STUMMER, B. E.; SCOTT, E. S. DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. **Mycology Research**, Cambridge, v.101, pt. 8, p. 923-932, Aug. 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. EMBRAPA-CENARGEN. Documento, 20.

FÖRSTER, H.; COFFEY, M. D. Mating behavior of *Phytophthora parasitica*: evidence for sexual recombination in oospores using DNA restriction fragment length polymorphisms as genetic markers. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 14, n. 4, p. 351-359, Dec. 1990.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. **Mycology Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 501-504, Apr. 1995.

FREIRE, E. C.; FARIAS, F.J.C.; AGIAR, P. H. Perdas estimadas da produção de algodão devido a pragas e doenças no centro-oeste-Safra 1998/99. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2., 1999, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 1999. p.1-3.

FREIRE, E. C.; SOARES, J. J.; FARIAS, F. J. C.; ARANTES, E. M.; ANDRADE, F. P. de; PARO, H.; LACA-BUENDIA, J. P. **Cultura do algodoeiro no estado de Mato Grosso**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 65p. EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, 23.

GALLITELI, M.; CIFARELLI, R. A., GIORIO, G.; FRANCESCO, C. Analysis of olive (*Olea Europaea* L.) cultivars by using AFLP markers and RAPD Markers. In: PLANT & ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9., 2001, Town & Country Hotel, San Diego, CA. **Proceedings...** San Diego, CA, 2001. p. 13-17.

GEORGE, M. L. C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 223-229, Mar. 1998.

GERALDI, I. O.; MIRANDA-FILHO, J. B. Adapted models for the analysis combining ability varieties in partial diallel crosses. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 431-440, jun. 1988.

GIATGONG, P.; FREDERIKSEN, R. A. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Piricularia oryzae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 59, n. 8, p. 1152-1157, Aug. 1969.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

HANSEN, H. N.; SNYDER, W. C. The dual phenomenon and sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 30, p. 419-422, 1943.

HINTZ, W. E.; JENG, R. S.; HUBBES, M. M.; HORGAN, P. A. Identification of three populations of *Ophiostoma ulmi* (Aggressive subgroup) by mitochondrial DNA restriction-site mapping and nuclear DNA fingerprint. *Experimental Mycology*, San diego, v. 15, n. 4, p.316-325, Dec. 1991.

IMOLESI, A. S. **Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho**. 1999. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1996. 44p.

IRAÇABAL, B.; ZERVASKIS, G.; LABARÈRE, J. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*, Reading, v. 141, n. 6, p. 1479-1490, June 1995.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; KELLY, R.; TAYLOR, B. A.; BULFIELD, G. Mouse DNA fingerprints: analysis of chromosome localization and germline stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 15, n. 7, p. 2823-2836, Apr. 1987.

JODLE, R. J. Legal aspects of varietal protection using molecular markers. In: SYMPOSIUM ON APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, Toronto, 1992. **Proceedings...** Toronto: CSSA/ASHS/AGA, 1992. p.50-52.

KAMMIOVIRTA, K.; PELTONEN, S.; JALLI, M.; KARJALAINEN, R. Molecular variation in *Drechslera teres* populations detected by RAPD markers. **Nord Jordbruksforskning**, v. 77, p. 146, 1995

KAUFMANN, P. J.; WEIDEMANN, G. J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. **Plant Disease**, St. Paul, n.11, p. 1289-1293, 1996.

KELLY, A.; ALCALÁ-JIMÉNEZ, A.R.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. The use of Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) of genomic DNA for the characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. In: SHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. (Ed.). **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification**. Wallingford: Redwood Press, 1994. 267p.

KESLLER, C. Class II restriction endonucleases. In: OBE, G. & BASLER, A. (Ed.). **Cytogenetics**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 225-279.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. Madison, 1995. 853p.

KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, p.29-48.

KINSCHERF, T. G.; LEONG, S. A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. **Chromosoma**, Berlin, v. 96, n. 6, p. 427-433, July 1988.

KISTLER, H. C.; BOSLAND, P. W.; BENNY, U.; LEONG, S.; WILLIAMS, P. H. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 9, p. 1289-1293, Sept. 1987.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.

KO, H.L.; COWAN, D.C.; HENRY, R.J.; GRAHAM, G.C.; BLAKENEY, A.B.; LEWIN, L.G. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Euphytica**, Wageningen, v. 80. n. 3, p. 179-189, 1994.

KOHN, L. M.; PESTSCHE, D. M.; BAILEY, S. R.; NOVAK, L. A.; ANDERSON, H. C. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 8, p. 1047-1051, Aug. 1988.

KOZLOWSKI, M.; STEPIEN, P. P. Restriction analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid to taxonomy. **Journal General Microbiology**, London, v. 128, n. 3, p. 471-476, Mar. 1982.

KUSTERS-VAN SOMEREN, M.; SAMSON, R. A.; VISSER, J. The use of RFLP nalysis in classification of the black *Aspergillus*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* agregate. **Current Genetics**, New York, v. 19, n. 1, p. 21-26, 1991.

LAZO, G. R.; PARK, Y. H.; KOGEL, R. J. Identification of RAPD markers linked to fiber strength in *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* interspecif crosses. In: **BIOCHEMISTRY OF COTTON WORKSHOP, 1994**, Galveston. **Proceedings...** Raleigh: Coton Incorporated, 1994. p.71-76.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M. Enfoque molecular na sistemática de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 197-230, 1998.

LEI DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES. Brasília, DF.1997. Senado Federal/ Secretaria Especial de editoração e Publicações, p.15-30.

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

MACKILL, D. J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 3, p. 889-894, May/June 1995.

- MANICOM, B. Q.; BAR-JOSEPH, M.; ROSNER, A.; VIGODSKY-HAAS, H.; KOTZE, J. M. Potential application of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the Fusaria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 669-672, May 1987.
- MANNERS, J. M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K. S.; IRWIN, J. A. G. **Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the Tropical pasture legume *Stylosanthes***. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.
- MARTIN, F. N. Maternal inheritance of DNA sexual crosses of *Pythium sylvation*. **Current Genetics**, New York, v. 16, n. 5/6, p. 373-374, Dec. 1989.
- MASEL, A. M.; IRWIN, J. A. G.; MANNERS, J. M. Mini-chromosomes of *Colletotrichum* spp. infecting several host species in various countries. **Mycology Research**, Cambridge, v. 97, n. 7, p. 852-856, July 1993.
- MCCLUSKEY, K.; MILLS, D. Identification and characterization of chromosome length polymorphisms among strains representing fourteen races of *Ustilago hordei*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 3, n. 6, p. 366-373, Nov./Dec. 1990.
- MCDONALD, B. A.; MARTINEZ, J. P. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1368-1373, Dec. 1990.
- MELO, L. C.; SANTOS, J.B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n.4, p. 601-608, 1999.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE. Imprensa Universitária, 1993. 277p.
- MEREDITH JUNIOR, W. R. RFLP associations with varietal origin and heterosis. In: BELTWISE COTTON CONFERENCES, 1992, Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council of America, 1992. p.607.
- MEYER, W.; KOCH, A.; NIEMANN, C.; BEYERMANN, B.; EPPLER, J. T.; BÖRNER, T. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprint. **Current Genetics**, New York, v. 19, n. 3, p. 239-242, 1991.

MIAO, V. P. W.; COVERT, S. F.; VANETTEN, H. D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science*, Washington, v. 254, n. 5039, p. 1773-1776, Dec. 1989.

MICHELMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MILACH, S. C. K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A.; DEL GIÚDICE, M. P.; SAKIYAMA, N.; SEDIYAMA, T.; MOREITA, M. A.; PORTUGAL, R. S. (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária** - Biowork-UFV. Viçosa: UFV, 1998. p. 43-58.

MILLER, J. D.; GREENHALGH, R.; WNG, Y. Z.; LU, M. *Trichothecene chemotypes* of the three *Fusarium* species. *Mycologia*, New York, v. 83, n. 1, p. 121-130, Jan./Feb. 1991.

MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R. M. C. **Noções básicas de micologia**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1989. 155p.

MULTANI, D. S.; LYON, B. R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. *Genome*, Ottawa, v. 38, n. 5, p. 1005-1008, Oct. 1995.

MURPHY, R. W.; SITES, J. W. JR.; BUTH, D. G. et al. Proteins I: isozyme electroforesis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.45-126.

NAMIKI, F.; SHIOMI, T.; NISHI, K.; KAYAMURA, T.; TSUGE, T. Pathogenic and genetic variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, n. 8, p. 804-810, Aug. 1998.

O'DONOUGHUE, L. S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M. E. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. *Crop Science*, Madison, v. 34, n. 5, p. 1251-1258, Sept./Oct. 1994.

O'NEILL, N. R.; BERKUM, P.; LIN, j.-j.; KUO, J.; UDE, G.; KENWORTHY, W.; SAUNDERS, J. Application of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* Pathogens of Alfafa. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n.7, p. 745-750, July, 1997.

OKOLI, C. A. N.; CARDER, J. H.; BARBARA, D. J. Molecular variation and sub-specific groupings within *Verticillium dahliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 2, p. 233-239, Feb. 1993.

PARK, Y. H.; KOHEL, R. J. Molecular markers to identify fiber mutants in F<sub>2</sub> segregating population. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 1993, Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1993. p.614.

PARLEVLIET, J. E. Can horizontal resistance be recognized in the presence of vertical resistance in plants exposed to a mixture of pathogen races? **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 3, p. 379, Mar. 1983.

PARLEVLIET, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 26, n. 1, p. 5-21, Feb. 1977.

PEDERSON, W. L.; KIESLING, R. L. Effect of inbreeding on pathogenicity in race 8 of *Ustilago hordei*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 11, p. 1207-1212, Nov. 1979.

PEIRCE, L. C.; BREWBAKER, J. L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **HortScience**, Alexandria, v. 8, n. 1, p. 17-22, Feb. 1973.

PENDSE, R.; MALHOTRA, S.; PAWAR, S. E.; KRISHNA, T. G. Use of DNA markers for identifying inbreds and hybrid seeds in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 29, n. 3, p. 503-508, 2001.

PERCY, R. G.; WANDEL, J. F. Allozyme evidence for the origin and diversity, cotton of *Gossypium barbadense* L. **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 79, n. 4, p. 529-542, 1990.

PIZZINATO, M. A.; CIA, E. Relação entre incidência de ramulose do algodoeiro em campo e detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, p. 15, jan./jun. 1987.

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

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. **Genética de fungos no laboratório**. Manaus: Editora da Universidade do Amazonas, 1998. 138p. Serie Fundamentos de Biotecnologia.

PRABHU, R. R.; WEBB, D.; JESSEN, H.; LUK, S.; SMITH, S.; GRESSHOFF, P. M. Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and Pedigree. *Crop Science*, Madison, v. 37, n. 5, p. 1590-1595, Sept./Oct. 1997.

REINISCH, A. J.; DONG, J. M.; BRUDOKER, C. L.; STELLY, D. M.; WENDEL, J. F.; PATERSON, A. H. A detailed RFLP map of cotton *Gossypium hirsutum* X *Gossypium barbadense*: Chromosome organization and evolution in a disomic polyploide genome. *Genetics*, Baltimore, v. 138, n. 3, p. 829-847, Nov. 1994.

ROCA MAGALLANES, M. G. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner). 1997. 82p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALGADO, K. C. C. Certificação da pureza genética em sementes híbridas por meio de marcadores morfológicos e moleculares. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, 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.

SCHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. **Modern Assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification**. Cambridge: CAB International, 1994. 267p.

SCHWARTZ, D. C.; CASTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, Cambridge, v. 37, n.1, p. 67-75, 1984.

SHAPPLEY, Z. W. JENKINS, J. N.; MCCARTY JUNIOR, J. C. Potential for RFLP mapping in cotton: In: BELTWIDE COTTON CONFERENCES, 1993, Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1993. p.610.

SILVA, E. A. A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microrganismos.** 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SMITH, J. S. C. The characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: Chromatographic data and isozymic data. **Euphytica**, Wageningen, v. 43, n. 1/2, p. 73-85, Sept. 1989.

SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, New York, v. 47, p. 85-140, 1992.

SMITH, S.; CHIN, E. The utility of random primer-mediated profiles, RFLP's and other technologies to provide useful data for varietal protection. In: SYMPOSIUM ON APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992, London. **Proceedings... London: CSSA/ASHS/AGA, 1992.** p.46-49.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal molecular Biology Berlin**, v. 98, p. 503, 1975.

STELLY, D. M. Iterfacing cytogenetics with the cotton genome mapping effort. In: BELTWISE COTTON CONFERENCES, 1993, Memphis. **Proceedings... Memphis: National Cotton Council, 1993.** p.1545-1550.

SUITER, K. A. Genetics of allozyme variation in *Gossypium arboreum* L. and *Gossypium herbaceum* L. (malvaceae). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 75, n. 2, p. 259-271, July 1988.

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

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

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

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

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

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de método de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, n. 3/4, p. 219-225, jul./dez. 1991.

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

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

TIGNON, M.; KETTMANN, R.; WATILLON, B. Aflp: Use For The Identification Of Apple Cultivars And Mutants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 521, p.219-226, 2000. Disponível em: [http://www.actahort.org/books/521/521\\_24.htm](http://www.actahort.org/books/521/521_24.htm) Acesso em: 25 nov.

TOFFANO, W. B. Estudos preliminares sobre a resistência de variedades à ramulose do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 69-71, 1963.

TYPAS, M. A.; GRIFFEN, A. M.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B. Restriction fragment length polymorfisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as na aid to the characterization of species and subspecies populations in the genus *Verticillium*. **FEMS Microbiology**. 40:612-621.1992.

TZENG, T-H.; LYNGLOLM, L. K.; FORD, C. F.; BRONSON, C. R. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen, *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics**, Baltimore, v. 130, n. 1, p. 81-96, Jan. 1992.

VANDERPLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemic and control**. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VELD, W. A. M.; VEENBAAS-RIJKS, W. J.; ILIEVA, E.; COCK, A. W. A. M.; BONANATS, P. J. M.; PIETERS, R. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, n. 9, p. 922-929, Sept. 1998.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. 1996. 129p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.

WANG, G. L. KOWALSKI, S.; ALTMAN, D. B.; EL-ZIK, K. M.; FRYXELL, P. A.; KOHEL, R. J.; SMITH, C. W.; THAXTON, P.; WING, R. A.; PATERSON, A. H. Introgression of agriculturally valuable QTL's from wide crosses in cotton, using DNA markers. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 1993, Memphis. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1993.p. 158.

WATKINS, G. M. **Compendium of cotton diseases**. Minneanopolis: APS Press, 1981.

WEIR, T. L.; HUFF, D. R.; CHRIST, B. J. ROMAINE, C. P. RAPD-PCR analysis of genetics variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycology*, New York, v. 90, n. 5, p. 813-821, Sept./Oct. 1998.

- WEISING K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprint in plants and fungi**. Florida: CRC Press, 1994. 322p.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213- 218, Dec. 1990.
- WELSH, J. MCCLELLAND, M. Genomic fingerprint using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 19, p. 5275-5279, Oct. 1991.
- WENDEL, J. F.; BRUBAKER, C. L. PERCIVAL, A. E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 79, n. 11, p. 1291-1310, Nov. 1992.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNNINSKY, J. J.; WHITE, J. W. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. 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, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.
- WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Abundance polymorphism, and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular General Genetics**, New York, v. 241, n. 1/2, p. 225-235, Oct. 1993.
- YU, Z.J.; PARK, Y.-H.; LAZO, G. R.; WOLF, N. C.; KOHEL, R. J. Molecular mapping of the cotton genome and its applications to cotton improvement. In: BELTWISE COTTON CONFERENCES, 1997, New Orleans. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1997. p.105.
- ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application n° 0534858 A1. 1993.

## CAPÍTULO 2

### EMPREGO DE MARCADORES AFLP PARA DIFERENCIAÇÃO DE ISOLADOS TÍPICOS DE *Colletotrichum gossypii* E DE *C. gossypii* VAR. *cephalosporioides* ASSOCIADOS AO ALGODOEIRO

#### 1 RESUMO

MANN, Renata Silva. Emprego de marcadores AFLP para diferenciação de isolados típicos de *Colletotrichum gossypii* e de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* associados ao algodoeiro. In. \_\_\_\_. Diversidade do Complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares. 2002. Cap.2 Tese (Tese-Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

Em algodão, doenças fúngicas como antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*) são responsáveis por grandes perdas na produção. As perdas maiores nas lavouras têm sido descritas para o causador da ramulose. Esses dois microrganismos podem ser transportados via sementes, e apesar de apresentarem sintomatologia característica, no teste de sanidade, se mostram muito semelhantes, podendo levar a um diagnóstico pouco preciso. Em face disso, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar a viabilidade do uso de marcadores moleculares do tipo AFLP na diferenciação dos referidos patógenos. Assim foram empregados 5 isolados típicos em sintomatologia no teste de patogenicidade e hábito de crescimento micelial, no teste de sanidade (*Blotter test*), de *C. gossypii* e 5 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Para o teste de patogenicidade, soluções de conídios foram pulverizadas em plantas das cultivares IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce (Epamig-5) e Redenção, com 30 dias de idade, e os sintomas avaliados aos 10 e 40 dias após a pulverização. Para o teste de sanidade amostras de 200 sementes das cultivares IAC-22 e ITA-90 foram inoculadas com culturas puras com 7 dias, sendo as avaliações das características miceliais avaliadas ao microscópio estereoscópico aos 7 dias após inoculação. Nas análises de

---

\*Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

marcadores AFLP o micélio fúngico foi obtido cultivando-se os isolados por 7 dias em meio líquido, e extrações do DNA executadas empregando-se Kit Dneasy Qiagen. Os isolados mostraram sintomatologia característica para ramulose e antracnose e características miceliais que foram empregadas para agrupar os isolados em dois grupos distintos. As análises de AFLP geraram um total de 418 bandas polimórficas, e 16 monomórficas para as diferentes combinações de primers usadas, que foram empregadas para cálculo de similaridades usando o Coeficiente Dice. A análise de AFLP revelou uma clara distinção dos isolados causadores da ramulose dos causadores da antracnose, em coerência com as características miceliais e patogenicidade.

---

**\*Comitê Orientador:** Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

## 2 ABSTRACT

MANN, Renata Silva. AFLP markers to differentiate typical isolates of *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides* associated with cotton. In: \_\_\_\_. Diversity of the *Colletotrichum* complex and cotton cultivars by molecular markers. 2002. Cap. 2 Thesis (Doctor Degree in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

Fungus disease in cotton, such as anthracnose (*Colletotrichum gossypii*) and ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*), cause for large yields losses. The greatest losses in the fields have been reported for the ramulose pathogen. These two microorganisms can be transported via seeds and although they present characteristics symptomatology, they are very similar in the blotter test, which can lead to an imprecise diagnostic. Thus the present study was carried out to assess the viability of using AFLP type molecular markers to differentiate the pathogens. Five isolates typical in symptomatology were used in the pathogenicity test and mycelial growth habit test, in the health test (*Blotter test*) of *C. gossypii* and five *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. For the pathogenicity test, conidial suspensions were sprayed on 30 days old plants of the IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce (Epamig-5) and Redenção cultivars and the symptoms were assessed 10 and 40 days after spraying. For the health test, 200 seed samples of the IAC-22 and ITA-90 cultivars were inoculated with pure cultures at seven days, and the mycelial characteristics were assessed under a stereoscopic microscope seven days after inoculation. In the AFLP marker analyses the fungal mycelia were obtained by cultivating the isolates for seven days in liquid medium and DNA was extracted with the Kit Dneasy Qiagen. The isolates showed characteristics symptomatology for ramulose, anthracnose and mycelial characterizations by which the isolates were grouped in two distinct clusters. The AFLP analyses generated a total of 418 polymorphic bands and 16 monomorphic bands for the different primer combinations that were used to calculate the similarities by Dice Coefficient. AFLP analysis showed a clear distinction of the isolates that cause ramulose from the anthracnose-causing isolates, in line with the mycelial characteristics and pathogenicity.

---

\* Guidance Committee: Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antonio Carlos Fraga – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são responsáveis por grandes perdas no rendimento das culturas, especialmente em épocas chuvosas como as que ocorrem no Brasil. Por meio de diversas pesquisas tem sido mostrada a ocorrência de muitas espécies de fungos em associação com sementes de algodoeiro produzidas em diversas regiões do país, bem como o efeito dessas espécies sobre a germinação das sementes e a transmissão às plantas (Bueno, Paiva & Bacchi, 2000; Teixeira, 2001).

*Colletotrichum gossypii*, o causador da antracnose em algodoeiro, um dos principais patógenos de doenças de plântulas, e causa lesões em todas as partes das plantas, apesar de se obter um bom controle do referido organismo com o tratamento de sementes com fungicidas. Em razão disso, o nível de tolerância de *C. gossypii* em associação com sementes no Brasil é objeto atual de discussão, havendo expectativa do estabelecimento de um valor de tolerância dentro de 1 a 2 anos.

Por sua vez a ramulose causada por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é uma das mais severas doenças em algodoeiro no Brasil (Davis et al., 1981). Essa doença apresenta no campo sintomas, que na maioria das vezes aparece após o plantio, e o uso de fungicidas algumas vezes, não é eficaz para controlar esse patógeno. Assim, no Brasil o nível de tolerância para esse fungo deve ser o mais baixo possível, visando a reduzir os problemas no campo e conseqüentemente a transmissão do patógeno pelas sementes (Grupo Técnico Permanente de Sanidade de Sementes, 2001-comunicação pessoal Machado, J. C.). Ambos os fungos, *C. gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides* não têm sido facilmente distinguidos usando o método convencional de incubação em papel de filtro.

Em face do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a viabilidade do uso de marcadores moleculares do tipo AFLP na diferenciação de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* que apresentam sintomas de patogenicidade e características de hábito de crescimento micelial típicos.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Análise e Técnicas Moleculares de Sementes e de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG (Brasil), e na Brigham Young University-Utah (USA).

Os isolados empregados foram cedidos por Maria Aparecida de Souza Tanaka e Maria Angélica Pizzinatto da seção de Fitopatologia do Instituto Agrônomo de Campinas (Tabela 1).

O inóculo foi recuperado mediante o cultivo dos isolados em meio BDA (extrato de 250 g de batata - 20 g de dextrose - 20 g de ágar por litro) por sete dias. Para o teste de patogenicidade foram utilizadas plantas das cultivares indicadas para plantio em Minas Gerais, IAC-22, ITA-90, ITA-96, Redenção (Epamig-4) e Precoce (Epamig-5) com 30 dias de idade. A inoculação foi realizada por meio de pulverizações da suspensão de inóculo, na concentração de  $10^6$  conídios/mL com incubação em câmara úmida por 72 horas. Na testemunha as plantas foram pulverizadas com água deionizada autoclavada. As plantas foram isoladas, umas das outras por meio de uma proteção plástica, evitando dessa forma, contato entre plantas inoculadas com os isolados dos diferentes fungos.

As avaliações foram realizadas aos 10 e 40 dias após a inoculação, de acordo com critérios estabelecidos por Cia (1977), com adaptações (Tabela 2). Vale ressaltar que a sintomatologia descrita por Cia é própria para se avaliar

ramulose. Dessa forma, plantas inoculadas aos 30 dias após a emergência, com isolados de *C. gossypii* não apresentaram sintomas e portanto receberam sempre a nota 1.

**TABELA 1-** Isolados fúngicos, doença e localidade de origem. UFLA, Lavras - MG, 2001.

Denominação Dos isolados	Nome da doença	Hospedeiros	Localidade de origem
CGC1	Ramulose <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba - SP
10166	Ramulose <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba - SP
6236	Ramulose <sup>1</sup>	<i>Bidens pilosa</i>	Piracicaba - SP
CR5	Ramulose <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ituverava - SP
P15	Ramulose <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba - SP
P13	Antracnose <sup>2</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba - SP
CG3	Antracnose <sup>2</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Piracicaba - SP
CA1	Antracnose <sup>2</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Uberaba - MG
CA12	Antracnose <sup>2</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Capinópolis - SP
I16.2	Antracnose <sup>2</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Uberaba - SP

Ramulose<sup>1</sup>: isolados com notas de patogenicidade = 5 segundo Tabela adaptada de Cia (1977).

Antracnose<sup>2</sup>: isolados com notas de patogenicidade iguais a 1, segundo tabela adaptada de Cia (1977).

Paralelamente os isolados foram avaliados de acordo com o hábito de crescimento micelial em sementes, seguindo metodologia sugerida por Tanaka, Menten & Machado (1996). Nesse caso, sementes de algodoeiro, deslintadas (cultivares IAC-22 e ITA-90), foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 % por 3 minutos, e secas por 24 horas em papel absorvente antes da inoculação. Amostras de 200 sementes foram inoculadas com *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Como inóculo empregaram-se culturas puras após 7 dias de incubação a 22° C ± 2° C em meio BDA. Cada placa continha 50 sementes em contato com a colônia fúngica. Essas foram inicialmente agitadas para que o contato ocorresse com toda a superfície da semente.

Após a inoculação, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade pelo método e incubação em papel de filtro. As avaliações foram efetuadas aos sete dias ao microscópio estereoscópico. Foram avaliadas as seguintes características típicas de *C. gossypii*: coloração rosa da cultura, micélio superficial e compacto, setas curtas e densas, conidióforos curtos e hialinos; e as típicas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*: coloração cinza da cultura, micélio aéreo e menos denso, setas longas e esparsas cobertas por massa micelial, conidióforos longos e aéreos.

**TABELA 2** - Critérios utilizados para avaliação dos sintomas da ramulose em plantas de algodoeiro, inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, segundo Cia (1977) com modificações. UFLA, Lavras - MG, 2001.

SINTOMAS	NOTAS
Planta sem sintoma (ausência de lesões).....	1
Plantas com manchas estreladas nas folhas do ponteiro.....	2
Planta com redução dos internódios inferior a 40%, quando comparada com a testemunha e com manchas foliares circulares e estreladas.....	3
Planta com superbrotamento e redução no porte de 40 a 60% quando comparada com a testemunha.....	4
Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido (redução do porte superior ou igual a 60%).....	5

#### - Análise de AFLP

Para essa análise o micélio fúngico foi obtido cultivando-se os isolados em meio líquido (10 g de glicose; 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g de KCl; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 g de extrato de levedura; 1 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 5% de polivinilpirrolidone; 1 mL  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  . 1% p/v para 1000 mL de água destilada esterilizada (Mills et al., 1994). Foram colocados 150 mL do meio líquido em erlenmeyer, que em seguida foram autoclavados a 121° C por 20

minutos. Posteriormente, em cada erlenmeyer foram colocados 3 discos de 5 mm cada, dos respectivos cultivos monospóricos dos isolados (Tabela 1), que foram incubados por 7 dias à temperatura de aproximadamente  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em mesa agitadora orbital (Modelo MA 140), a 17 rpm. O micélio resultante foi filtrado a vácuo em câmara de fluxo laminar, e posteriormente liofilizado em liofilizador Modelo L4KR Edwards, por 48 horas, sob temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ , pressão  $10^{-1}$  mbar.

As extrações do DNA nuclear foram executadas empregando Kit DNeasy Qiagen (1999), seguindo o protocolo de triturar cerca de 100 mg de tecido vegetal, lise e precipitação. Em seguida, o macerado foi centrifugado, e ao sobrenadante adicionou-se etanol. Posteriormente realizou-se uma minicentrifugação e lavagem com eluente até a obtenção final do DNA.

As análises de AFLP foram desenvolvidas usando os seguintes protocolos.

### **Restrição e Digestão do DNA genômico:**

Adicionaram-se a um tubo de 1,5 mL os seguintes componentes (DNA (100ng/ $\mu\text{L}$ ) 2,5  $\mu\text{L}$ , tampão de reação 5X (350 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 mM KCl, 5 mM 2-mercaptoetanol) 5,0  $\mu\text{L}$ , *Eco RI* / *Mse I* 2,0  $\mu\text{L}$ , água destilada 25  $\mu\text{L}$ , para um volume total de 25  $\mu\text{L}$ ). Essa mistura foi incubada por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , e a seguir incubada por 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  para inativação das endonucleases de restrição. O tubo foi acondicionado em gelo para breve centrifugação.

### **Ligação de adaptadores:**

Adicionou-se ao tubo anteriormente submetido à restrição e digestão 24  $\mu\text{L}$  de solução de ligação do adaptador, e 1  $\mu\text{L}$  de enzima  $T_4$  DNA ligase. Essa mistura foi gentilmente agitada, submetida à centrifugação, para sedimentação dos componentes e incubada a 20 °C por 12 horas. Após esse período, a mistura foi submetida à diluição na proporção de 1:10 (10  $\mu\text{L}$  de mistura para 90  $\mu\text{L}$  de tampão TE). A porção restante foi armazenada em freezer à temperatura de - 20° C.

### **Reações de pré-amplificação:**

As reações de pré-amplificação foram realizadas em tubos de 0,2 mL, nos quais adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de DNA obtidos da mistura de ligação, 5  $\mu\text{L}$  de Tampão PCR 10X, 1  $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA polimerase (1 unidade/ $\mu\text{L}$ ) para obter um volume total de 51  $\mu\text{L}$ . Esses reagentes foram gentilmente misturados e rapidamente centrifugados para sedimentação dos componentes. As reações foram realizadas em termociclador Pelkin-Elmer modelo 9600, em que as condições de amplificação foram 94° C por 30 segundos para desnaturação do DNA, 60 segundos a 56° C para anelamento do primer e 60 segundos a 72° C para amplificação, perfazendo um total de 20 ciclos. Após as reações, a mistura foi mantida a 4° C.

### **Marcação dos primers:**

Os primers foram marcados com  $^{33}\text{P}$  em tubos de 1,5mL nos quais adicionaram-se 18  $\mu\text{L}$  de primer *Eco RI*+2 pares de bases, 10  $\mu\text{L}$  de água destilada, 10  $\mu\text{L}$  de tampão Kinase 5X, 10  $\mu\text{L}$  de  $\gamma\text{P}^{33}$ (3.000 Ci/mmol), 2  $\mu\text{L}$

enzima T4 Kinase, para um volume total de 50 $\mu$ L. Os reagentes foram gentilmente misturados e brevemente centrifugados para sedimentação dos reagentes. A mistura foi incubada por 1 hora à 37° C, e posteriormente visando à inativação dessa enzima com a finalidade de parar a reação, procedeu-se a incubação por 10 minutos a 70° C, e após a reação a mistura foi mantida à 4°C.

### **Reações de amplificação seletiva:**

Para cada par de primers, adicionaram-se os seguintes componentes em um tubo de 1,5 mL: 5  $\mu$ L primer *EcoRI* marcado, 45  $\mu$ L de primer *MseI* contendo DNTPs, para um volume total de 50  $\mu$ L, perfazendo uma mistura denominada mistura 1. Em outro tubo de 1,5 mL adicionaram-se 79  $\mu$ L de água destilada, 20  $\mu$ L de tampão PCR 10X, 1  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 unidades/ $\mu$ L), para um volume total de 100  $\mu$ L. Para cada reação de amplificação misturaram-se 5 $\mu$ L de reações pré-amplificadas submetidas a diluições na proporção de 1: 50, com tampão TE, 5  $\mu$ L da mistura 1, 10  $\mu$ L da mistura 2, perfazendo um total de 20  $\mu$ L. As reações foram realizadas em termociclador, usando um ciclo de 30 segundos a 94° C, 30 segundos à 65° C e 60 segundos à 72° C. A seguir foram realizadas amplificações com temperaturas com queda de 0,7° C a cada ciclo, num total de 12 ciclos. Adicionalmente realizaram-se 23 ciclos de 30 segundos à 94° C, 30 segundos à 56° C e 60 segundos à temperatura de 72° C, perfazendo um tempo total de 2 horas e 2 minutos.

**TABELA 3** - Combinação de primers (Gibco BRL), utilizada em estudo sobre variabilidade do complexo *Colletotrichum* do algodoeiro. UFLA, Lavras - MG, 2001.

Pré Amplificação	Combinação de primers	
	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
AC	EAT	MCG
AC	EAT	MCA
AC	EAT	MCG
AC	EAT	MCC
AC	EAA	MCA
AC	EAA	MCC
AC	EAA	MCT
AC	EAA	MCG

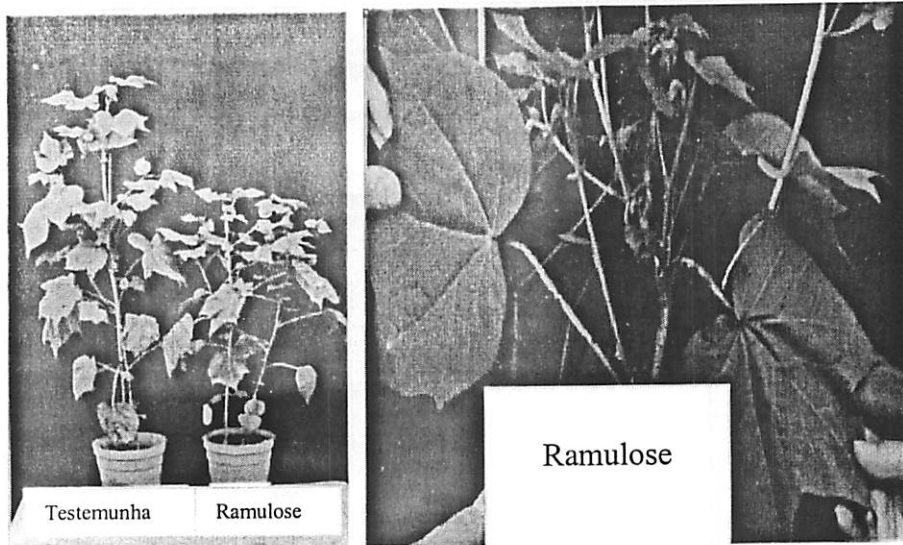
Após as reações de PCR, adicionou-se um volume de 20  $\mu\text{L}$  de corante de formamida (98% de formamida, 10 mM de EDTA, azul de bromofenol, xileno cianole) para cada Reação. As reações foram posteriormente aquecidas a 90° C por 3 minutos e imediatamente colocadas em gelo. 3  $\mu\text{L}$  dessas reações foram carreados por 2 horas e 30 minutos em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5 %, que foram pré-corridos por 15 minutos. A eletroforese foi conduzida em condições de 90 V constantes. Os géis ao final da migração, foram secos em papel Whatman 3MM. Subseqüentemente, autoradiogramas (Filme de Raios X, Kodak) foram expostos por 1 a 7 dias à -80° C, e revelados para visualização dos fragmentos de AFLP.

Para a análise dos dados, foram consideradas a presença e a ausência de fragmentos de AFLP, os quais foram obtidos em auto-radiogramas e transferidos para uma matriz, na qual a ausência de uma dada banda foi denominada por 0 e a presença por 1. As diferenças de intensidade de bandas não foram consideradas uma vez que o marcador tipo AFLP é dominante. As análises foram desenvolvidas com o programa NTSYS-PC 2.1 (Rohlf, 2000), usando o procedimento SIMQUAL. As similaridades ( $S_{g_{ij}}$ ) entre os genótipos analisados foram calculadas com o Coeficiente de Dice (1945) (Duarte & Santos, 1999).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teste de patogenicidade os isolados causadores da ramulose apresentaram variações de sintomatologia em função das cultivares, e foram classificados com notas de patogenicidade variando de 3 a 5. Isso provavelmente ocorreu porque os isolados mostravam sintomas bem evidentes e todos do grupo causadores da ramulose (Cgc1, 10166, 6236, CR5 e P15) apresentaram-se bastante agressivos. Por outro lado, os isolados do grupo causadores da antracnose (P13, Cg3, CA1, CA12, I16.2) foram classificados com a nota 1, isto é, a ausência de sintomas para plantas inoculadas com esses microrganismos aos 30 dias.

A sintomatologia para os isolados causadores de ramulose consistiu de superbrotamento dos galhos, tornando a planta com aspecto ramalhudo, porte baixo, galhos contorcidos e dilatados, folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas se apresentavam com áreas cloróticas, com evolução para lesões necróticas arredondadas, alongadas ou angulares, às vezes acompanhadas de perfurações. As lesões necróticas, deprimidas ou elevadas, algumas vezes fendilhadas, foram observadas nas hastes e nos pecíolos das folhas (Figura 1). Sintomas estes citados em concordância com Abrahão & Costa (1949), Abrahão (1961), Drumond (1961), Kimati (1980), Costa & Fraga Junior (1937), Tanaka, (1990, 1995) e Dudienas (1990).



**FIGURA 1** - Sintomatologia específica de isolados causadores de ramulose. UFLA, Lavras - MG. 2001.

As análises de AFLP geraram um total de 418 bandas polimórficas, e 16 monomórficas para as diferentes combinações de primers considerados (Tabela 3). Essa análise possibilitou a clara distinção dos isolados causadores da antracnose daqueles que causam ramulose (Figura 2). As bandas que permitiram essa distinção variaram de 50 a 300 pares de bases, e podem ser observadas ao longo do gel (Figura 2).

Em trabalhos realizados por Carvalho e colaboradores (1996), Vieira (1996) e também por Silva-Mann e colaboradores (2002), por meio de marcadores RAPD e isoenzimas, foi possível a distinção entre isolados causadores de ramulose e antracnose, que apresentavam sintomatologia para ramulose e antracnose, usando marcadores RAPD e isoenzimáticos.

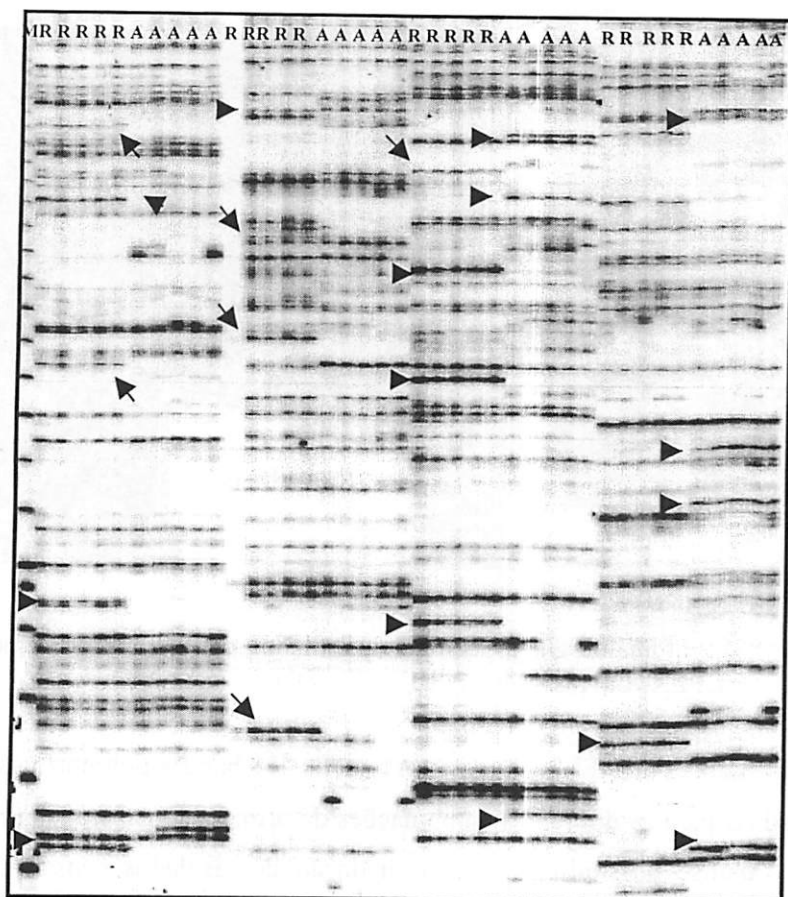


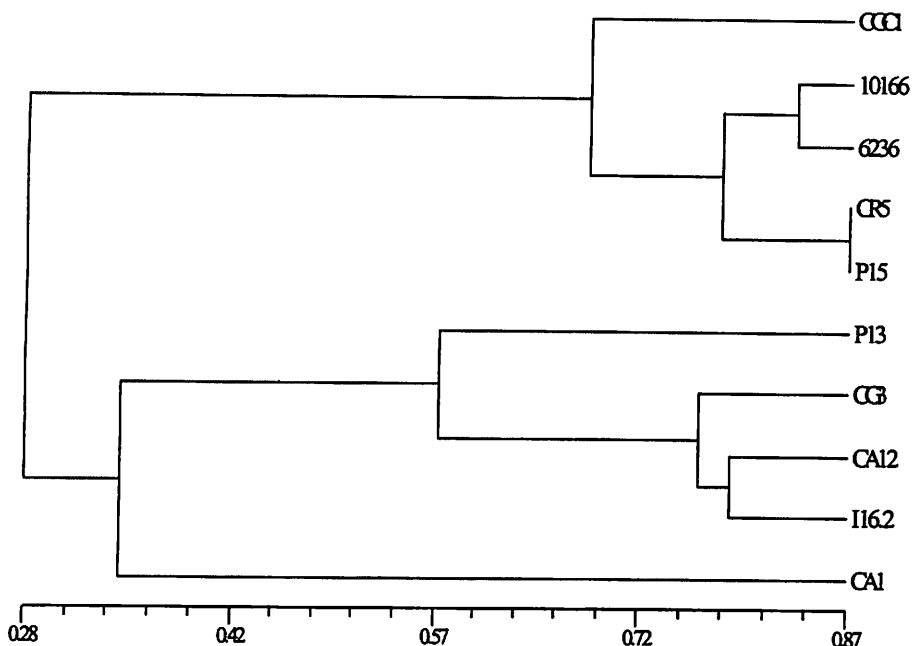
FIGURA 2 - Fragmentos de AFLP, em gel de poliacrilamida, de isolados de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. UFLA, Lavras - MG.2001.

M= Marcador de pesos moleculares com bandas a cada 50 bases  
 R = sintomas ramulose; A = sintomas de antracnose  
 ▲ polimorfismo

Tanto os marcadores morfo-culturais, quanto os moleculares do tipo AFLP, separaram de forma similar os dois grupos de *Colletotrichum* (*C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*).

De acordo com os resultados, há concordância com os dados obtidos por Freeman & Rodrigues (1995), que empregando técnicas moleculares em 39 isolados de *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*, obtiveram agrupamentos correspondendo à classificação usando dados morfológicos. No entanto, Sutton (1992) ressalta que nenhum progresso nas relações genéticas, para a identificação de fungos fitopatogênicos, tem sido alcançado somente se baseando em caracteres morfológicos. A classificação das relações genéticas entre as várias espécies que compõem este gênero, usando características morfológicas é difícil, por causa das mudanças que podem ocorrer nas características dos isolados sob várias condições, afetando, por exemplo, a pigmentação, tamanho, e estrutura do acérvulo e septos nas setas bem como sua ocorrência (O'Neill, et al., 1996).

Vale ressaltar que, neste estudo, apesar de os testes de características morfo-culturais terem separado *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, de forma similar aos dos marcadores moleculares do tipo AFLP (Figura 3), esse último detectou níveis diferenciais de diversidade genética dentro de cada grupo.



**FIGURA 3** - Dendrograma de similaridades entre *C. gossypii* (P13, CG3, CA12, CA-1, I16.2) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC1, 10166, 6236, CR5, P15), baseado em dados de AFLP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Com relação à divergência dos isolados, ficou constatada, maior variabilidade em isolados descritos como sendo os causadores da antracnose (Tabela 4).

Para o grupo constituído pelos isolados causadores de antracnose, as similaridades variaram de 50 a 70%, ao passo que, no constituído pelos causadores da ramulose, as similaridades foram em torno de 80% a 96% (Tabela 4).

Em razão da maior divergência entre os isolados causadores da antracnose, permite-se inferir sobre a origem da variedade *cephalosporioides*,

que pode ter sido um variante patogênico de *C. gossypii*, como sugerido por Chitarra (1996).

**TABELA 4** - Estimativas das similaridades genéticas, em porcentagem (coeficiente de Dice), entre isolados de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, baseadas em dados de AFLP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Genótipos	CGC1	10166	6236	CR5	P15	P13	CG3	CA1	CA12	I16.2
CGC1	100,0									
10166	80,70	100,0								
6236	81,50	90,53	100,0							
CR5	81,71	88,54	91,75	100,0						
P15	80,36	82,74	86,18	92,76	100,0					
P13	38,71	46,01	48,58	43,61	46,38	100,0				
CG3	44,91	52,72	59,14	57,45	53,22	78,03	100,0			
CA1	12,44	13,90	15,97	14,98	13,71	52,04	49,40	100,0		
CA12	37,76	54,16	52,52	52,49	48,07	67,10	85,48	52,34	100,0	
I16.2	38,91	52,89	53,41	52,43	48,30	73,33	87,32	51,22	87,77	100,0

Isolados: CGC1, 10166, 6236, CR5, P15 = *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*; P13, CG3, CA1, CA12, I16.2 = *Colletotrichum gossypii*

Observa-se pelos resultados (Tabela 4), que os isolados fúngicos CR5 e P15 apresentam alta similaridade entre si (92,76 %). Vale ressaltar que apesar de serem provenientes de campos de produção diferentes, ambos isolados são originários do Estado de São Paulo. É interessante observar que isolados provenientes de um mesmo campo, embora infectando espécies diferentes, apresentam similaridade superior a 90%. Neste sentido, enquadra-se, por exemplo, o isolado 10166 oriundo de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) e o 6236 de plantas de picão (*Bidens pilosa*), ambos apresentando sintomas de ramulose. Essa habilidade em infectar diferentes espécies tem sido

relatada por Bailey & Jeger (1992) para fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*. Esta facilidade de usar diferentes espécies de hospedeiros, faz com que os fungos permaneçam em restos culturais e em plantas daninhas. Em termos evolutivos é um aspecto favorável à sua disseminação e adaptação às condições adversas do meio ambiente. Mas do ponto de vista agrônomo, isso gera implicações importantes para a instalação de campos de produção para a cultura do algodoeiro e para estratégias de controle de doenças.

Dentro do grupo dos isolados causadores da ramulose, o mais divergente, foi o Cgc1, com uma similaridade média de 81,06 % em relação aos demais isolados (Tabela 4). Esse isolado apresentou sintomas de patogenicidade, bem característicos como redução de internódios, e lesões foliares em forma de estrela, bem como a ocorrência de acérvulos, quando inoculado artificialmente em plantas de algodoeiro.

Apesar de não ter sido detectado nenhum grau de divergência pelo teste de características morfo-culturais, o isolado denominado CA1, apresentou uma similaridade média de 51,25 %, quando comparado com os demais, sendo o mais divergente (Tabela 4). No entanto, quando esse isolado foi comparado com os causadores da ramulose, a similaridade média encontrada foi de apenas 14,20 %. Dessa forma, apesar da baixa similaridade desse isolado em relação aos demais causadores da antracnose (51,25%), o mesmo se mostra muito divergente dos causadores da ramulose (85,80%) o que evidencia a eficiência na distinção dos mesmos usando dados de AFLP. O mesmo é válido para o isolado Cgc1, causador de ramulose. Apesar de se mostrar o mais divergente dentro do grupo dos causadores de ramulose, pela técnica AFLP, quando comparado com os causadores da antracnose, esse mostra similaridade média de 34,55%. Dessa forma, pelos resultados das estimativas de similaridade, pode-se inferir que similaridades inferiores a 34% permitem a distinção dos isolados causadores da antracnose dos da ramulose.

Esses resultados reforçam a importância da técnica de AFLP para a identificação e caracterização de isolados fúngicos, como já mencionado por Kelly et al (1994), na diferenciação entre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, que apresentam alta correlação entre os dados de AFLP e os de patogenicidade. Esses isolados puderam ser distinguidos em nível de forma especiais, o que demonstra a potencialidade da técnica para esse tipo de estudo.

A concordância dos dados obtidos com marcadores AFLP com as características morfo-culturais e patogenicidade, talvez se deva ao fato de os isolados aqui empregados se mostrarem bem característicos com relação à patogenicidade, agressividade e, portanto, características fenotípicas. Ressalta-se, no entanto, a importância desse tipo de conhecimento, o qual possibilita a clonagem dessas bandas e a construção de primers específicos, visando ao desenvolvimento de kits de diagnóstico que possibilitam a detecção rápida e segura de isolados altamente agressivos, que causam os maiores danos e prejuízos econômicos, quanto da sua introdução em campos de algodão.

## 6 CONCLUSÕES

O uso de marcadores AFLP permite a diferenciação dos isolados causadores da ramulose dos isolados causadores da antracnose.

Os isolados causadores da antracnose apresentam-se mais divergentes que os causadores da ramulose, baseando-se nos dados de similaridade por marcadores AFLP.

Os agrupamentos obtidos com dados AFLP são coerentes com dados de características morfo-culturais e patogenicidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. Controle à ramulose tardia do algodoeiro. **O Biólogo**, 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 Biólogo**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 59-60, mar. 1949.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.
- BUENO, Y. R. M.; PAIVA, F. de A.; BACCHI, L. M. A. Qualidade sanitária de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, n.4, p. 463-466, out./dez. 2000.
- CHITARRA, G. S. **Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade**. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 3, n. 3, p.167-193, maio/jul. 1977.
- COSTA, A. S.; e FRAGA JÚNIOR, C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 12, n. 5/7, p. 249-252, maio/jul. 1937.
- DAVIS, R. G.; BIRD, L. S.; CHAMBERS, A. Y.; GARBER, R. H.; HOWELL, C. R.; MINTON, E. B.; STERNE, R.; JOHNSON, L. F. Seedling disease complex. In: Watkins, G. M. (Ed.). **Compendium of cotton diseases**. St. Paul: American Phytopathology Society, 1981.
- DICE, L. R.. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.
- Dneasy Plant Mini Handbook For DNA isolation from plant tissue**. Qiagen. March, 1999. 16p.

DRUMOND, O. A. A ramulose em Minas Gerais. **Boletim de Agricultura**, Belo Horizonte, v. 10, n.v3/12, p. 95-97, 1961.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B.; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, Sept. 1999.

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

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. **Mycology Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 501-504, Apr. 1995.

KELLY, A.; ALCALÁ-JIMÉNEZ, A.R.; BAINBRIDGE, B. W.; HEALE, J. B.; PÉREZ-ARTÉS, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. **The use of amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) of genomic DNA for the characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.** In: SHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. (Ed.). **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification.** Wallingford: CAB International, 1994. 267p.

KIMATI, H. Doenças do algodoeiro- *Gossypium* spp. In: GALLI, F. (Ed.) **Manual de fitopatologia.** São Paulo: Editora Ceres, 1980. v. 2, p.29-48.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. **Detection of the Anthracnose Pathogen *Colletotrichum*.** In: SCHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. (ED.). **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification.** Wallingford: CAB International, 1994. p. 183-189.

O'NEILL, N. R. Pathogenic variability and host resistance in the *Colletotrichum trifolii*/ *Medicago* pathosystem. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 4, p. 450-457, Apr. 1996.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 2,10.** New York, 2000.

SILVA-MANN, R.; CARVALHO, K. C. S.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2002 (no prelo).

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**. 1990. 111p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

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

TEIXEIRA, H. **Variabilidade de *Acremonium strictum* e sua transmissibilidade e efeitos em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 127p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. 1996. 123p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

## CAPÍTULO 3

### VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DO COMPLEXO *Colletotrichum* ASSOCIADOS À SEMENTES E PLANTAS DE ALGODOEIRO USANDO MARCADORES AFLP.

#### 1 RESUMO

MANN, Renata Silva. Variabilidade genética em isolados do complexo *colletotrichum* associados à sementes e plantas de algodoeiro usando marcadores AFLP. In.\_\_\_\_. Diversidade do Complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares. 2002. Cap.3 Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

O conhecimento da variabilidade genética de microrganismos tem auxiliado na detecção de patógenos e contribuído para a escolha de estratégias de controle dos mesmos. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a variabilidade de isolados de *Colletotrichum* obtidos de plantas e de lotes de sementes de algodoeiro por meio de marcadores de DNA do tipo AFLP. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Técnicas Moleculares (Sementes-UFLA) e na Brigham Young University (BYU), empregando 54 isolados de 16 municípios do Brasil, classificados pelo *blotter test* e teste de patogenicidade, em *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. No *blotter test* amostras de 200 sementes (variedades IAC-22, ITA-90) inoculadas com culturas de 3 dias em BDA foram avaliadas para as características: coloração da cultura, posição e densidade do micélio, tipo de setas e conidióforos. Para a patogenicidade soluções de  $10^6$  conídios/mL foram pulverizadas em plantas com 30 dias de idade (variedades IAC-22, ITA-90, ITA-96, Epamig-5 e Redenção) e sintomas avaliados aos 10 e 40 dias após a pulverização. Para as análises de AFLP o micélio foi cultivado por 7 dias em meio líquido, e extrações do DNA executadas em Kit Dneasy Qiagen. As análises de AFLP geraram 300 bandas polimórficas, empregadas para cálculo de similaridades usando o Coeficiente Dice. Nos agrupamentos, dados de hospedeiros, classificação morfo-cultural, origem e fonte doadora não mostraram uma coerência com os grupos formados. No entanto, quando se considerou a parte da planta da qual os isolados foram obtidos, os isolados de

---

\*Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

folhas foram agrupados em um mesmo subgrupo e os obtidos de sementes, em outro, demonstrando uma possível ocorrência de órgão da planta-especificidade. Para os causadores da ramulose e antracnose a similaridade média foi de 80,09 % e 78,39 %. A menor similaridade para ramulose foi de 53,67% e para antracnose 10,85 %, o que demonstra a grande variabilidade desses patógenos.

---

**\*Comitê Orientador:** Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

## 2 ABSTRACT

MANN, Renata Silva. Genetic variability in *Colletotrichum* complex isolates associated with cotton seeds and plants using AFLP markers. In:\_\_\_\_. Diversity of the *Colletotrichum* complex and cotton cultivars by molecular markers.2002. Cap.3 Thesis (Doctor degree in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

Knowledge of genetic variability in microorganisms has helped in pathogen detection and contributed to control strategy choice. This study was carried out to assess the variability of *Colletotrichum* isolates obtained from cotton plants and seed batches by AFLP type DNA markers. The study was carried out at the Laboratory for Molecular Techniques (UFLA) and at Brigham Young University (BYU, USA) using 49 isolates from 16 Brazilian counties, classified by the blotter and pathogenicity tests as *C. gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. In the blotter test samples of 200 seeds (IAC-22, ITA-90 varieties) inoculated with 3-day cultures in BDA were assessed for the characteristics culture coloring, mycelia position and density, seta and conidiophore type. For the pathogenicity test,  $10^6$  conidia/mL solutions were sprayed on 30-day old plants (IAC-22, ITA-90, ITA-96, Epamig-5 and Redenção varieties) and symptoms were assessed 10 and 40 days after spraying. For the AFLP analyses, the mycelia were cultivated for 7 days in liquid medium and the DNA was extracted by Kit Dneasy Qiagen. The AFLP analyses generated 300 polymorphic bands from which the similarity was calculated by the Dice Coefficient. In the clusters, host, morpho-cultural classification, donor origin and source were not coherent with the clusters formed. However, when the part of the plant from where the isolates had been obtained was considered, the leaf isolates were grouped in the same sub-cluster and those obtained from seeds clustered in another. The mean similarity of the isolates was 84,42%. The mean similarity was 80.09% and 78.39% for ramulose and anthracnose causers. The least similarity for ramulose was 53.67% and 10.85% for anthracnose that demonstrates the great variability of these pathogens in association with cotton plants and seeds.

---

\***Guidance Committee:** Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

Os fungos são um grande e diverso grupo de organismos, estando presentes em uma variabilidade de formas, em quase todo habitat. Muitos esforços têm sido feitos para controlar as doenças causadas por fungos por meio de programas de melhoramento, incluindo seleção, modificação genética de ambos, hospedeiros e patógenos, e introdução de cultivares resistentes. O sucesso dessas medidas depende da variabilidade genética da população e dos sistemas genéticos por meio dos quais ela interage com o hospedeiro e regula sua própria estrutura genética.

Fungos possuem uma variedade de mecanismos para introduzir variação genética em seu ciclo de vida, durante a reprodução sexual ou independentemente dela (McDonald, 1990; Kinscherf & Leong, 1988; Kistler & Miao, 1992; Roca Magallanes, 1997; Veld et al., 1998). A variabilidade resultante afeta as relações entre patógeno e hospedeiro em muitos níveis, e ajuda o fungo a se adaptar prontamente às mudanças nas condições ambiente, incluindo a introdução de novos genótipos de hospedeiros.

Avanços têm sido obtidos com o uso de marcadores moleculares, para identificar e quantificar essa variabilidade (Kozlowski & Stepien, 1982; Shots et al., 1994; Chitarra, 1996; Silva-Mann et al., 2002; Vieira, 1996). A vantagem de marcadores moleculares é ilimitada por causa do grande número de locos polimórficos que eles podem detectar em genótipos individuais para acesso direto da variação genética das populações.

O marcador molecular do tipo AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), foi relatado por Zabeau (1993), como uma tecnologia capaz de criar grande número de fragmentos a partir de nanogramas de DNA genômico, usando reações em condições de alta estringência que

garantem uma maior reprodutibilidade. Como resultado, padrões de bandas de DNA podem ser gerados com maior resolução e conteúdo de informação.

A técnica de AFLP tem sido empregada para acessar os níveis de variação genética entre espécies e isolados do gênero *Colletotrichum*. O'Neill e colaboradores (1996) caracterizaram os patógenos de alfafa em dois níveis dentro do complexo *Colletotrichum*. Essa caracterização foi coerente com a patogenicidade, a qual até então era feita por meio de marcadores morfológicos, que falhavam na identificação desses isolados.

O microrganismo *Eutypa armeniacae* ou *E. lata*, tem apresentado dúvidas com relação à classificação taxonômica para espécies. O estudo de 115 isolados de *Eutypa*, por AFLP, análise de seqüência de DNA ribossomal da ITS, permitiu distinguir os isolados obtidos de *Quercus lobata* daqueles que infectam uvas. A análise das seqüências de DNA ribossomal sustentou o agrupamento obtido pelos dados de AFLP. Ainda se pôde observar uma habilidade das espécies desse patógeno em infectar hospedeiros nativos e cultivados, sugerindo o potencial para as espécies nativas de servirem como fonte de inóculo para novas fontes de infecção. Essas informações foram valiosas na formulação de estratégias de manejo e controle da doença (Descenzo et al., 1999).

Para os microrganismos causadores de antracnose e ramulose em algodoeiro, informações sobre a variabilidade desses patógenos e dados sobre marcadores moleculares de DNA, têm sido escassos. Essas informações podem abrir perspectivas para estudos com esses fungos, e ainda podem servir como base para elucidções taxonômicas, entendimentos sobre a variabilidade e alternativas que os mesmos podem utilizar para ampliar essa variabilidade.

Pela presente pesquisa teve-se o objetivo de avaliar a similaridade genética de isolados de *Colletotrichum* obtidos de plantas e de lotes de sementes de algodoeiro.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Técnicas Moleculares e Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG (Brasil) e na Brigham Young University - Provo - Utah (USA).

Os 49 isolados empregados neste trabalho (Tabela 1) foram obtidos da Micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - MG, isolados de lotes de sementes de 15 diferentes municípios do Brasil e identificados pelo teste de sanidade (*blotter test*) e hábito de crescimento determinado por Chitarra (1996). O inóculo foi recuperado mediante o cultivo dos isolados em meio BDA (extrato de 250 g de batata - 20 g de dextrose - 20 g de ágar por litro) por sete dias. Para o teste de patogenicidade foram utilizadas plantas das cultivares indicadas para plantio no Estado de Minas Gerais, IAC-22, ITA-90, ITA-96, Redenção (Epamig-4) e Precoce (Epamig-5) com 30 dias de idade. A inoculação foi realizada por meio de pulverizações da suspensão de inóculo, na concentração de  $10^6$  conídios/mL com incubação em câmara úmida por 72 horas. Na testemunha, as plantas foram pulverizadas com água deionizada autoclavada. As plantas foram isoladas umas das outras por meio de uma proteção plástica, evitando, dessa forma, contato entre plantas inoculadas com os isolados dos diferentes fungos

**TABELA 1-** Características dos isolados por região de origem, hospedeiro e notas de patogenicidade obtidos de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* segundo critérios de Cia (1977). UFLA, Lavras - MG, 2001.

Isolado	Patogenicidade	Fonte	Localidade	Hospedeiro
Cgc2	2	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cgc2.7	2	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cgc3	2	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB007/95 IAC 20-A
Cgc6	2	IAPAR	Cambará-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cgc8	2	CATI	Lucélia-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - Lu012/95 IAC21
Cgc9	2	CATI	Inúbia P.-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - Lu010/95 IAC20
Cgc10.10	2	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cgc11	2	IAPAR	Itambaracá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> -IAPAR 71-PR3
Cgc12	2	COAMO	Campo Mourão-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - L001- IAC20
Cgc14	2	COAMO	Campo Mourão-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - L001-IAC20
Cgc15	2	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB 007/95 IAC 20-A
Cgc16	2	COROL	Londrina-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAC20- PR
Cgc17	2	COROL	Jataizinho-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - PRO3
Cgc17.1	2'	COROL	Jataizinho-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - PRO3
Cgc18	2	COROL	Assai-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - PRO3
Cgc19	2	Cervalinho	Cervalinho-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB013/95 IAC21-A
Cgc20	2	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB007/95 IAC 20-A
Cgc23	2	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71- PR3
Cgc25	2	IAPAR	Cambará-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71- PR3
Cgc26	2	IAPAR	Itambaracá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71- PR3
Cg1	1	UFLA	Lavras-MG	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup>
Cg2	1	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71 -PR3
Cg3	1	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB 007/95 IAC 20-A
Cg4.3	1	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> -IAPAR 71- PR3
Cg9	1	CATI	Inúbia P.-SPta	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - Lu 010/95 IAC-20
Cg11	1	IAPAR	Itambaracá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cg14	1	COAMO	Campo Mourão-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - L010/95 IAC-20
Cg15	1	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB010/95- IAC20
Cg17	1	COROL	Jataizinho-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - PRO3
Cg 17.6	1	COROL	Jataizinho-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - PRO3

“...Continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Cg18	1	COROL	Assai-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> -PRO3
Cg20	1	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IB 010/95 IAC 20
Cg20.1	1	Ibitinga	Ibitinga-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> IB 010/95 IAC 20
Cg27	1	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAPAR 71-PR3
Cg28	1	COTTON	Capinópolis-MG	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAC21
Cg29	1	COTTON	Ituverava-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> - IAC20
P13	1	Lavras	Lavras-MG	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup> -
CA1	1	Piracicaba	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup>
CA12	1	Capinópolis	Capinópolis-MG	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup> - IAC21
I16.2	1	Uberlândia	Uberlândia-MG	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup> - ITA90
Cgc1	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup>
Cgc4	2	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> -IAPAR 71-PR3
Cgc5	3	IAPAR	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> <sup>1</sup> -IAPAR 71-PR3
CR5	5	IAC	Ituverava-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup> -IAC20
3564	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
3739	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
6236	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>Bidens pilosa</i> <sup>2</sup>
6727	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>Bidens pilosa</i> <sup>2</sup>
6739	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
10166	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
11086	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>Amendoim bravo</i> <sup>2</sup>
11325	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
11326	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>
P15	5	IAC	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> <sup>2</sup>

<sup>1</sup> : microrganismos isolados de sementes de algodoeiro

<sup>2</sup> : microrganismos isolados de plantas doentes de algodoeiro

As avaliações foram realizadas aos 10 e 40 dias após a inoculação, de acordo com critérios estabelecidos por Cia (1977), com adaptações (Tabela 2).

**TABELA 2** - Tabela adaptada de Cia (1977) para avaliação dos sintomas em plantas de algodoeiro, inoculado com fungos do complexo *Colletotrichum*. UFLA, Lavras - MG, 2001.

SINTOMAS	NOTA
Planta sem sintoma (ausência de lesões).....	1
Plantas com manchas estreladas nas folhas do ponteiro.....	2
Planta com redução dos internódios inferior a 40 %, quando comparada com a testemunha e com manchas foliares circulares e estreladas.....	3
Planta com superbrotamento e diminuição do seu crescimento (redução no porte de 40 a 60 % quando comparada com a testemunha.....	4
Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido (redução do porte superior ou igual a 60 %).....	5

A extração de DNA foi em micélio fúngico obtido cultivando-se os isolados em meio líquido (10 g de glicose; 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g de KCl; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 g de extrato de levedura; 1 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 % de polivinilpirrolidone; 1 mL  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \%$  p/v para 1000 mL de água destilada esterilizada) (Mills et al., 1994). Foram colocados 150 mL do meio líquido em erlenmeyer de 250 mL, em seguida foi autoclavado a  $121^\circ \text{C}$  por 20 minutos. Posteriormente, em cada erlenmeyer foram colocados, 3 discos de 5 mm cada, dos respectivos cultivos monospóricos dos isolados (Tabela 1), que foram incubados por 7 dias à temperatura de aproximadamente  $22^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ , em mesa agitadora orbital (Modelo MA 140), a 17 rpm. O micélio resultante foi filtrado a vácuo em câmara de fluxo laminar, e posteriormente liofilizado em liofilizador Modelo L4KR Edwards, por 48 horas, sob temperatura de  $-40^\circ \text{C}$ , pressão  $10^{-1}$  mbar. As extrações do DNA foram executadas empregando Kit DNeasy Qiagen (1999).

As análises de AFLP foram desenvolvidas usando o protocolo da Life Technologies (decriso no Capítulo 2). A amplificação seletiva foi feita com primers *Eco RI* + 2 pares de bases e *Mse I* + 2 pares de base, para as diferentes

combinações dos primers (Tabela 3), sendo os primers *Eco RI* marcados com radioisótopo fósforo 33 .

**TABELA 3** - Combinação de primers (Gibco BRL), utilizada em estudo sobre variabilidade do complexo *Colletotrichum* do algodoeiro. UFLA, Lavras - MG, 2001.

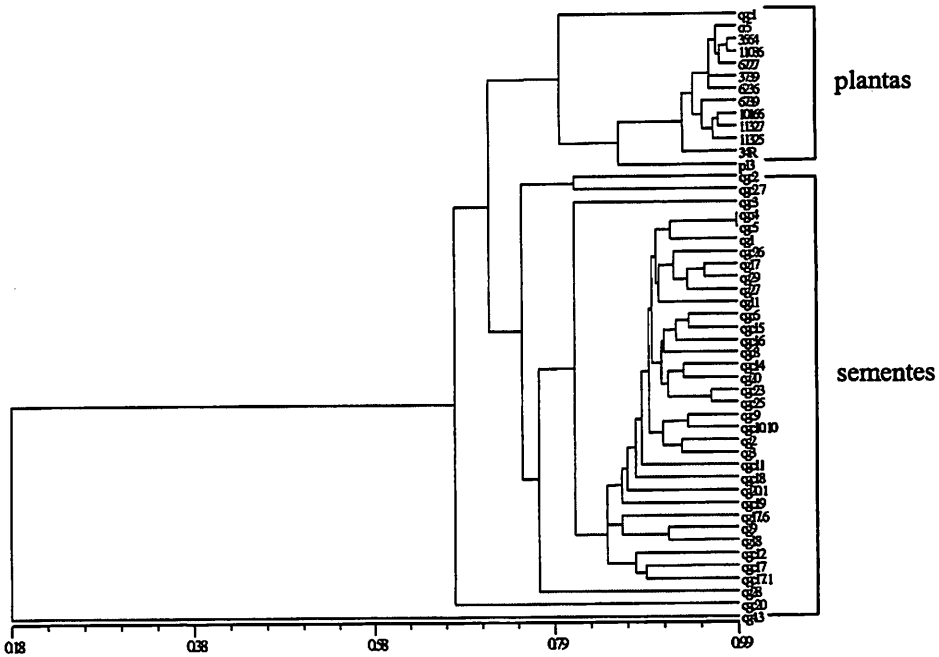
Pré Amplificação	Combinação de primers	
	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
AC	EAT	MCG
AC	EAT	MCA
AC	EAT	MCG
AC	EAT	MCC
AC	EAA	MCA
AC	EAA	MCC
AC	EAA	MCT
AC	EAA	MCG

Os produtos das ampliações foram carreados por 2 horas e 30 minutos em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5 %, que sofreram uma pré-corrida por 15 minutos. Os géis ao final da migração, foram secos em papel Whatman 3MM. Subseqüentemente, autoradiogramas (Filme de Raios X, Kodak) foram expostos por 1 a 7 dias a  $-80^{\circ}$  C para visualização dos fragmentos de AFLP.

Para a análise dos dados, foram consideradas a presença e a ausência de fragmentos de AFLP, nos quais a ausência de uma dada banda foi denominada por 0 e a presença por 1. As diferenças de intensidade de bandas não foram consideradas, uma vez que o marcador tipo AFLP é dominante. As análises foram desenvolvidas com o programa NTSYS-PC 2.1 (Rohlf, 2000), usando o procedimento SIMQUAL. As similaridades entre os genótipos analisados foram calculadas com o Coeficiente de Dice (1945).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de marcadores AFLP, os isolados do complexo *Colletotrichum* que infectam o algodoeiro foram agrupados em dois grandes subgrupos (Figura 1). Ressalta-se que os isolados Cgc 20 e Cg 4.3, apesar de terem sido classificados pelo teste de características morfo-culturais em *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* pelo teste de patogenicidade, obtiveram notas 2 e 1 (Tabela 1) e apresentaram-se como os mais divergentes, não sendo incluídos em nenhum dos dois subgrupos quando da utilização dos dados gerados por marcadores AFLP (Figura 1).



**FIGURA 1** - Dendrograma de similaridades de isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, baseados em dados AFLP, Lavras-MG, 2001.

Dentro do primeiro subgrupo o isolado que se apresentou mais divergente em relação aos demais (divergência média de 14%) (Tabela 1A) foi o isolado P13, o único classificado pelo teste de características morfo-culturais como o causador da antracnose que pelo teste de patogenicidade obteve nota 1, ou seja, ausência de sintomas para ramulose. Os demais isolados agrupados nesse subgrupo obtiveram nota 5 pelo teste de patogenicidade, ou seja, sintomatologia bem característica de ramulose. No segundo subgrupo a similaridade média entre os isolados foi de 80 % (Tabela 1 A), apesar de se ter nesse subgrupo 14 isolados classificados como causadores da antracnose e 22 da ramulose pelo teste de características morfo-culturais. Pelo teste de patogenicidade esses isolados apresentaram sintomatologia bastante variada, obtendo notas de 1 a 5. Ressalta-se que todos os isolados agrupados no segundo subgrupo foram anteriormente isolados de sementes que encontravam-se preservados em óleo mineral na micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes (UFLA). Os isolados agrupados no primeiro subgrupo foram anteriormente isolados de plantas e encontravam-se preservados em meio BDA na Micoteca do IAC. Vale ressaltar, no entanto, que todos os isolados foram recuperados em meio BDA. Observa-se pela Figura 1 que quando se considerou o agrupamento utilizando informações sobre o material obtido para isolamento, obteve-se uma perfeita relação entre dados e agrupamentos, ou seja, todos os isolados obtidos de plantas com sintomatologia característica para *Colletotrichum* foram agrupados em um mesmo subgrupo e os obtidos de sementes, em outro subgrupo.

Apesar de o agrupamento ter sido em função do material utilizado para o isolamento dos fungos, parece que a forma como eles foram preservados pode ter influência na relação dados/agrupamento. Tanto assim, que no Capítulo anterior em que todos os isolados foram obtidos de plantas, porém todos

preservados em meio BDA, foi possível uma perfeita diferenciação entre os causadores da ramulose, dos da antracnose pelo uso da técnica de AFLP.

Por outro lado, existe ainda a possibilidade de uma segunda hipótese, ou seja, embora essas informações não se relacionem diretamente à especificidade à hospedeiros, elas indicam uma provável existência de um reconhecimento específico entre plantas e/ou sementes e patógenos. A especificidade de alguns microrganismos por determinados órgãos em plantas tem sido relatada para *Discula* sp. e um isolado não identificado como Lb, os quais foram freqüentemente encontrados em folhas. Para o gênero *Phomopsis* sp. também tem sido relatada certa especificidade por determinados órgãos de plantas, esse microrganismo foi encontrado em maior quantidade em hastes. Este estudo ainda demonstrou que a ocorrência de alguns fungos em folhas em determinadas épocas do ano pode depender do estágio de desenvolvimento da planta, sendo observado um certo grau de especificidade dependendo do hospedeiro (Sahashi, 2002). Assim devem ocorrer eventos de interação patógeno-hospedeiro que aqui se relacionam a plantas-patógeno e semente-patógeno, que ditam a ocorrência ou não de patogenicidade a qual pôde ser verificada por marcadores AFLP. No entanto, isso até o momento é mais uma especulação, uma vez que falta um entendimento científico para explicar esses dados. Poderia se supor que alguns isolados de parte aérea sofram uma possível alteração genética de forma a permitir que o isolado que estava infectando a planta seja transmitido por suas sementes e/ou vice-versa.

Os resultados encontrados, dessa forma, demonstram o potencial de variabilidade que microrganismos podem apresentar pela habilidade dos mesmos, em buscar meios para sua sobrevivência. Os diferentes substratos dos quais os fungos foram isolados também representam papel importante nas interações patógenos-hospedeiro, levando os microrganismos a alterações pela presença de elicitores. Hansen & Snyder (1938) observaram em isolados obtidos

de um único esporo, variações na morfologia da colônia, o que pode ser entendida, como conseqüente alteração no material genético. Alguns autores têm citado alterações em fungos principalmente os pertencentes ao gênero *Colletotrichum* e *Fusarium* (Bayley & Jeger, 1992; Pederson & Kiesling, 1979). Outros têm enfatizado a variação que pode ser gerada por cultivos sucessivos *in vitro* de microrganismos como os pertencentes ao gênero *Magnaporthe* (Giatgong & Frederikson, 1969). Essas citações demonstram que podem existir mecanismos que ampliam a variabilidade de fungos filamentosos, levando a uma série de alterações fenotípicas e genotípicas que não são facilmente explicadas.

A reprodução sexuada tem sido relatada como a principal fonte de variabilidade em fungos, no entanto, existem relatos de fungos mitospóricos, que apresentam grande variabilidade quando cultivados em laboratório ou campo (Rodrigues, 1987).

As técnicas moleculares têm sido ferramentas úteis para detectar e identificar tal variabilidade dos fungos. Em *Mycosphaerella graminicola*, entre 93 isolados de um único campo de produção foi possível a identificação de dois haplotipos distintos usando marcadores RFLP. Essa variação entre isolados de um mesmo campo, em que os fungos apresentam reprodução assexual, parece ser bem comum, e tem sido relatada em fungos que apresentam meiose em parte do seu ciclo de vida, e também em fungos nos quais a meiose não é relatada. Tal variação pode ser explicada como mais uma necessidade em gerar variabilidade por esses microrganismos, que sempre se encontram sujeitos a condições desfavoráveis para o seu crescimento e sobrevivência.

Mesmo estando esses organismos divididos em 2 subgrupos, a similaridade média encontrada para os isolados causadores da ramulose foi de 80,09 %, dos quais o menor valor de similaridade encontrado foi de 53,67 % entre os isolados Cgc 20 e Cgc1, e o maior valor de 99,03 % entre os isolados Cgc 4 e Cgc 5 (Tabela 1A). Esses isolados citados anteriormente foram obtidos

de sementes, com exceção do isolado Cgc 1 obtido de plantas de algodoeiro. O menor valor de similaridade encontrado para os isolados Cgc 20 e Cgc1, talvez se deva ao fato de os mesmos terem sido obtidos de sementes e plantas de algodoeiro e preservados de forma diferente. Já os isolados que apresentaram maior valor de similaridade dentro dos causadores da ramulose, foram obtidos de sementes provenientes da mesma região, Andirá-PR e de um mesmo hospedeiro, a cultivar IAPAR 71-PR311. É válido ressaltar que nem sempre se obteve uma relação entre similaridade fenotípica ou genotípica e a origem geográfica para isolados fúngicos. Para esses isolados, a maior similaridade talvez se deva ao fato de os mesmos terem sido obtidos de uma mesma cultivar hospedeira, que coincidentemente foi obtida da mesma região.

De forma análoga, esses resultados concordam com os obtidos por Teixeira (2001), que encontrou resultados para pesquisa com *Acremonium strictum*, em que isolados provenientes de um mesmo Estado, apresentaram fenótipos e genótipos mais variados do que isolados oriundos de Estados diferentes. Apesar disso, esse autor correlacionou esse evento com a utilização de isolados obtidos de hospedeiros com base genética diversificada, os quais poderiam exercer alguma influência sobre o comportamento dos isolados, maior que a origem geográfica. Com esses resultados reforça-se a potencialidade da técnica de AFLP na avaliação da diversidade genética de microrganismos.

Para os isolados causadores de antracnose a média de similaridades encontrada foi de 78,39%, e o menor valor de similaridade é de 10,85% para os isolados Cg 3 e Cg 4.3, e o maior valor de similaridade entre os isolados Cg 17 e Cg 29 (95,49%) (Tabela 1A). O isolado Cg 3 e Cg 4.3 foram obtidos de sementes, sendo Cg 3 obtido de sementes da região de Ibitinga-SP e da cultivar IB007/95 IAC, e o Cg 4.3 de Andirá-PR da cultivar IAPAR 71-PR3 (Tabela 1). Os isolados com maior valor de similaridade Cg 17 e Cg 29, foram obtidos de Ituverava-SP da cultivar IAC-20, e de Jataizinho-PR da cultivar PRO3. Po meio

desses resultados sugere-se uma alta proximidade entre os isolados, apesar de os mesmos terem sido isolados de diferentes cultivares e região de origem diferentes.

Os isolados 6236, 6727 e 11086 foram isolados de outras espécies de hospedeiros, que estavam em campos de produção de algodão, como *Bidens pilosa* e Amendoim bravo (Comunicação pessoal por Maria Aparecida de Souza Tanaka e Maria Angélica Pizzinato- fonte relatório de entrada de materiais para análise-IAC). Essas espécies são plantas daninhas, que foram encontradas nos campos de produção de Piracicaba, que apresentavam sintomas de ramulose. Observa-se que esses isolados foram agrupados em um mesmo subgrupo, conforme pode ser visto pelo dendrograma de similaridade (Figura 1). Esses três isolados foram eficientes em infectar plantas de algodoeiro, o que demonstra a capacidade desses de infectarem outras espécies. Isso, sem dúvida, é um fator complicante na erradicação da doença em campos de produção, uma vez que essas plantas invasoras podem permanecer nos locais de produção, tornando-se um foco permanente do referido patógeno. Ressalta-se que esses isolados apresentaram-se, nos testes de patogenicidade, altamente agressivos, mostrando sintomas que iam de lesões à redução de internódios e superbrotamento.

Quando nas análises de agrupamento se consideraram, como tratamentos, os hospedeiros, a classificação morfo-cultural, local de origem e fonte doadora, os dendrogramas de similaridade baseados em marcadores de AFLP, não diferiram entre si, ou seja, não existiu uma relação direta entre isolados de *Colletotrichum* e hospedeiros, classificação morfo-cultural, localidade e fonte cedente desses isolados.

Por outro lado, nas análises de agrupamento, quando se considerou como tratamento o material do qual foram isolados os fungos em questão, observou-se uma perfeita relação entre isolados e material utilizado no isolamento destes.

Dessa forma, todos os isolados obtidos de plantas doentes no campo foram agrupados em um mesmo subgrupo e os obtidos de sementes em outro subgrupo.

Como já mencionado anteriormente, apesar de o agrupamento ter sido em função do substrato vegetal utilizado como fonte para o isolamento dos fungos, a forma como eles foram preservados deve ser considerada na relação dados/agrupamentos.

Características como as empregadas nesta pesquisa podem dar suporte à constatação de que uma série de eventos podem estar envolvidos na expressão de caracteres morfo-culturais, bem como de patogenicidade, o que nem sempre pode ser amostrado pela análise de seqüências amplificadas por técnicas como os marcadores moleculares de AFLP. Tais caracteres podem ser controlados por vários genes, e ainda esses microrganismos podem estar sujeitos a eventos para ampliação da sua variabilidade.

Dessa forma, novas perspectivas surgem e podem levar à necessidade de novas pesquisas para melhor compreensão desse patógeno, principalmente quando em associação com sementes, bem como o modo utilizado para preservação *in vitro*.

A posição taxonômica dos isolados do complexo *Colletotrichum*, considerados neste estudo, e em outros, permanece não resolvida uma vez que nem todos foram agrupados com base em critérios de patogenicidade e morfologia.

## 6 CONCLUSÕES

Os isolados do complexo *Colletotrichum* associados ao algodoeiro apresentam alta similaridade, com um valor médio de 84,42%.

A similaridade média dos isolados causadores da ramulose e da antracnose é alta (80,09% e 78,39%), e o menor valor para ramulose é de 53,67% e para antracnose, de 10,85%.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHEUNG, W. D. AFLP DNA fingerprinting of *Colletotrichum* spp. Disponível em: <<http://wpi.edu/~wcheung/rppaper>> Acesso em: 25 nov. 2001.

CHITARRA, G. S. Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 3 n. 3, p. 167-193, maio/jun. 1977.

DESCENZO, R. A.; HARRINGTON, T. C. Use of (CAT)<sub>5</sub> as a DNA fingerprint probe for fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, n. 4, p. 534-540, Apr. 1994.

DICE, L. R.. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, Washington, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.

Dneasy Plant Mini Handbook. For DNA isolation from plant tissue. Qiagen. March, 1999. 16p.

GIATGONG, P.; FREDERIKSEN, R. A. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Piricularia oryzae*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 59, n.8, p. 1152- 1157, Aug. 1969.

HANSEN, H. N.; SNYDER, W. C. The dual phenomenon and sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 30, p. 419-422, 1943.

- KINSCHERF, T. G.; LEONG, S. A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. **Chromosoma**, Berlin, v. 96, n. 6, p. 427-433, July 1988.
- KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.
- KOZLOWSKI, M.; STEPIEN, P. P. Restriction analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid to taxonomy. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, n. 3, p. 471-476, Mar. 1982.
- MCDONALD, B. A.; MARTINEZ, J. P. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1368-1373, Dec. 1990.
- 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: CAB International, 1994. p.183-189.
- O'NEILL, N. R. Pathogenic variability and host resistance in the *Colletotrichum trifolii*/ *Medicago* pathosystem. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 4, p. 450-457, Apr. 1996.
- PEDERSON, W. L.; KIESLING, R. L. Effect of inbreeding on pathogenicity in race 8 of *Ustilago hordei*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n.11, p. 1207-1212, Nov. 1979.
- ROCA MAGALLANES, M. G. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner). 1997. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 2.10**. New York, 2000.

SAHASHI, N.; MIYASAWA, Y.; KUBONO, T.; ITO, S. Frequently isolated endophytic fungi from the japanese beech: detection of major fungal endophytes, their seasonal variations in colonization rate and organ specificity.

SCHOTS, A.; DEWEY, F. M.; OLIVER, R. **Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification.** Cambridge: CAB International, 1994. 267 p.

SILVA-MANN, R.; MACHADO, J. da C.; CARVALHO, K.C.S.; VIEIRA, M. G. G. C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, mar. 2002.

VELD, W. A. M.; VEENBAAS-RIJKS, W. J.; ILIEVA, E.; COCK, A. W. A. M.; BONANATS, P. J. M.; PIETERS, R. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 9, p. 922-929, Nov. 1998.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro.** 1996. 123p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting.** European Patent Application n° 0534858 A1. 1993.

## CAPÍTULO 4

### DIVERSIDADE GENÉTICA EM CULTIVARES DE ALGODOEIRO POR MEIO DE PROTEÍNAS E MARCADORES MOLECULARES AFLP.

#### 1 RESUMO

MANN, Renata Silva. **Diversidade genética em cultivares de algodoeiro por meio de proteínas e marcadores moleculares AFLP.** In. \_\_\_\_\_. **Diversidade do Complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares.** 2002. Cap.3 Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

A diversidade genética de variedades pode ser avaliada por meio de marcadores moleculares com características de distinguibilidade, estabilidade e homogeneidade, principalmente quando se visa a indicação de novos descritores para a proteção e registro de cultivares. Nessa pesquisa os marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor foram pela primeira vez empregados, aliando-se o uso de marcadores AFLP. Sementes de onze variedades de algodoeiro foram multiplicadas na área experimental do Departamento de Agricultura-UFLA para o cultivo e colheita sob as mesmas condições climáticas, culturais e nutricionais, e as análises de proteínas realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Análise de Sementes, e as análises de marcadores AFLP na Brigham Young University (USA). Para a análise de proteínas foram usadas amostras de 200 sementes (variedades Precoce (Epamig-5), Delta Opal, Deltapine, IAC-20, IAC-21, IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce Alva, Precoce Liça e Redenção (Epamig-4)) que foram moídas, trituradas e empregadas para a extração de proteínas. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8 % (gel separador) e 6 % (gel concentrador) e os géis corados com Comassie Blue 0,05% e por prata. Para a análise de AFLP o DNA (variedades Precoce (Epamig-5), IAC-22, ITA-90, ITA-96 e Redenção (Epamig-4)), foi extraído usando-se Kit DNeasy Qiagen. A pré-amplificação efetuada com primers com bases A e C, e amplificação seletiva usando primers *Eco RI* e *MseI* com 3 pares de bases e as corridas realizadas em gel de poliacrilamida 12,5%. Os géis foram expostos a filmes de raios X e após 7 dias revelados. O polimorfismo nos perfis eletroforéticos de proteínas permitiu o agrupamento das variedades em três grupos, de acordo com o tamanho, número

---

\***Comitê Orientador:** Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

e intensidade das bandas. No cálculo das similaridades por meio de marcadores AFLP empregou-se o programa NTSYS-pc versão 2.1 e coeficiente Dice, e o agrupamento obtido pelo método UPGMA. As variedades com maior similaridade por meio de marcadores de proteínas extraídas pelo calor foram a Precoce Alva e a Precoce Liça, que são materiais semigaméticos. As proteínas extraídas pelo calor apresentaram-se como marcadores promissores para agrupar e diferenciar materiais geneticamente próximos. A variedade ITA-90 foi a mais divergente tanto pelos marcadores AFLP quanto pelas proteínas extraídas pelo calor. Apesar dos marcadores AFLP terem detectado baixo polimorfismo, eles permitiram o agrupamento das variedades em função da genealogia.

---

**\*Comitê Orientador:** Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

## 2 ABSTRACT

MANN, Renata Silva. Cotton genetic diversity by proteins and AFLP molecular markers. In: \_\_\_\_. Diversity of the *Colletotrichum* complex and cotton cultivars by molecular markers. 2002. Cap.4 Thesis (Doctor degree in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

The genetic diversity in varieties can be assessed by molecular markers with distinguishing stability and homogeneity characteristics, especially when the indication of new markers is required to protect and register cultivars. Biochemical markers of heat extracted proteins were used for the first time in this study to assess genetic diversity, together with AFLP markers, in cotton plants by AFLP molecular markers and heat-extracted proteins. Seeds of eleven cotton varieties were multiplied in the experimental area of the Department of Agriculture at the Federal University of Lavras for cultivation and harvest under the same physiological and nutritional conditions. The proteins were analyzed in the Laboratory of Biotechnology and Seed Analysis at the Department of Agriculture at UFLA, and the AFLP markers were analyzed at Brigham Young University, USA. For the protein analysis, samples of 200 seeds (Precoce (Epamig-5), Delta Opal, Deltapine, IAC-20, IAC-21, IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce Alva, Precoce Lica and Redenção) were ground and used for protein extraction. Electrophoresis was carried out in SDS-PAGE polyacrylamide gel at 8% (gel separator) and 6% (gel concentrator) and the gels stained with Comassie Blue 0.05% and silver. For the AFLP analysis the DNA (varieties Precoce (Epamig-5), IAC-22, ITA-90, ITA-96 and Redenção (Epamig-4) was extracted with the Kit Dneasy Qiagen. The pre-amplification was performed by primers with A and C bases and selective amplification using Eco RI and MseI primers with three pairs of bases and the runs were made in 12.5% polyacrylamide gel. The gels were exposed to x ray films and developed after 7 days. The polymorphism in the protein electrophoretic profiles enabled the varieties to be grouped in three clusters, according to band size, number and intensity. The NTSYS-pc program version 2.1 and the Dice coefficient were used to calculate similarities by AFLP markers, and the clustering was obtained by the UPGMA method. The varieties with greater similarity by markers and heat extracted proteins were Precoce Alva and Precoce Liça, that are semigametic materials. The heat extracted proteins showed promise as markers for clustering and differentiating genetically close materials. The ITA-90 variety

---

**\*Guidance Committee:** Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

was the most divergent for both the markers. The AFLP markers were little polymorphic, but still permitted the clustering of the varieties by genealogy.

---

**\*Guidance Committee:** Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.



### 3 INTRODUÇÃO

Em face da Lei de Proteção e Registro de materiais melhorados, cresce a necessidade de desenvolver e/ou adaptar método para caracterização das cultivares.

No Brasil, a Lei de proteção de Cultivares, sancionada em 25 de abril de 1997, abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de materiais genéticos. Para uma cultivar ser registrada e protegida, ela deve alcançar os critérios de distinção, uniformidade e estabilidade (Bayle, 1983).

Para o registro e proteção dessas cultivares têm sido usado freqüentemente descritores morfológicos e fisiológicos. No entanto, esses apresentam limitações, não só por demandarem acompanhamentos durante todo o ciclo da cultura, mas também por demandarem grandes áreas, e em determinadas situações se mostram instáveis para a distinção, pois baseiam-se no fenótipo (Brasil, 1997).

Estudos com descritores têm sido realizados na tentativa de se distinguir genótipos próximos (Imolesi, 1999; Vieira, 2000; Salgado, 2001). Os marcadores bioquímicos de proteínas em sementes têm sido usados para a certificação de cultivares (ISTA- International Seed Testing Association, 1996; AOSA-Association of Official Seed Analysis, 1991). Alguns desses marcadores, como as hordeínas em cevada, as secalinas em centeio, glutelinas em trigo, aveninas em aveia, zeínas em milho, lecitinas e vicilinas em *Phaseolus*, leguminina em *Pisum sativum*, glicinina em soja, têm auxiliado pesquisadores na seleção assistida por marcadores (Kiegel & Galili, 1995; Vieira, 2000). No entanto, esses marcadores bioquímicos podem se apresentar pouco informativos, pelo baixo polimorfismo em materiais com base genética estreita.

Tem sido descrito um grupo de proteínas robustas, hidrofílicas, que são extraídas em condições de altas temperaturas em água, e que se acumulam nos

últimos estádios de desenvolvimento das sementes (Kiegel & Galili, 1994; José, 1999). Pela natureza conservada dessas proteínas percebe-se que as mesmas podem ser promissoras na identificação e certificação de cultivares.

Essa categoria de proteínas tem sido citada em sementes de algodoeiro, como exercendo papel na preservação de membranas celulares (Baker et al., 1988; Guimarães, 2000). No entanto, não existem na literatura informações sobre o polimorfismo destas para fins de caracterização de cultivares.

Marcadores moleculares do tipo DNA são ferramentas úteis para auxílio na caracterização de cultivares. Estudos com marcadores moleculares do tipo RAPD, Multani & Lyon (1995) caracterizaram cultivares de *Gossypium hirsutum* e uma cultivar de *G. barbadense* sob cultivo na Austrália, e esses ainda permitiram verificar a ocorrência de 98,9% de similaridade entre cultivares relacionadas geneticamente.

A análise de AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. Essa técnica descrita inicialmente por Zabeau (1993), tem sido utilizada de forma crescente para diversas finalidades. Essa técnica permite a obtenção de um grande número de locos, o que pode ser útil na caracterização de cultivares.

Estudos da diversidade genética, baseados nesses marcadores, têm ampliado o conhecimento sobre a estrutura genética das cultivares de algodoeiro (Beltrão, 1999).

Com a presente pesquisa avaliou-se a diversidade genética de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor e de marcadores moleculares de DNA do tipo AFLP.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG (Brasil) e na Brigham Young University-Utah (USA).

### - **Análise de Proteínas**

As sementes das variedades utilizadas (tabela 1), foram multiplicadas na área experimental da Universidade Federal de Lavras, em parcelas com área útil de 10m x 10m, o que permitiu que as mesmas fossem produzidas sob as mesmas condições de cultivo, visando à obtenção de sementes com a mesma qualidade fisiológica. A colheita foi realizada manualmente e a secagem efetuada ao sol até que as mesmas atingissem 13% de teor de água.

**TABELA 1 - Genealogia e principais características agronômicas de cultivares de algodoeiro utilizadas na pesquisa. UFLA, Lavras-MG. 2001.**

Cultivar	Genealogia	Características
Precoce (Epamig 5)	GH 1175-5, Stoneville 213, C-25-1-80	Precocidade (rápida frutificação)
Delta Opal	Introdução Australiana	Resistência a viroses
Delta Pine Acala 90	Introdução Americana	Resistência a ramulose
IAC-20	IAC-17, Tamcot SP-37	Precocidade, produtividade, resistência múltipla a doenças e nematóides e alta percentagem de fibra
IAC-21	Stoneville 2B, Delfos, IAC-12	Precocidade, produtividade e resistência múltipla à doenças e nematóides
IAC-22	IAC-20, GH 1197-5	Produtividade e precocidade
CNPA Itamarati 90	Delta Pine AC-90	Produtividade e resistência à ramulose
CNPA Itamarati 96	DPL, Auburn 56, M. D. Beja, Epamig-3	Produtividade, resistência à ramulose e viroses
Precoce Liça	Semi-gamética	Semigamética
Precoce Alva	Semi-gamética	Semigamética
Redenção (Epamig -4)	Auburn 56, DACRM3, IAC-17	Produtividade, resistência à fusariose e alta percentagem de fibra
Color	Seleção de população nativa do Nordeste Brasileiro	Fibras com coloração marrom

Fonte: Cavalleri e Gridi-Papp (1993).

Adaptado por Napoleão Esberard de Macedo Beltão (1999), com modificações.

Para extração de proteínas utilizou-se amostra de 200 sementes de cada variedade (Precoce (Epamig-5), Delta Opal, Delta Pine, IAC-20, IAC-21, IAC-22, ITA-90, ITA-96, Precoce Alva, Precoce Liça e Redenção (Epamig-4)), as quais foram homogeneizadas e trituradas em moinho sob refrigeração a 4°C (Moinho Tecnal- TE 631). O pó obtido dessa trituração foi pesado (100 mg) e acondicionado em tubos de 1,5 mL juntamente com 1mL de tampão de extração

(500mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM PMSF). Essa mistura foi homogeneizada utilizando-se vortex por aproximadamente 1 minuto, e posteriormente centrifugada a 16.000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado em banho-Maria a 85°C por 15 minutos e novamente centrifugado como citado anteriormente. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o precipitado descartado. Antes da aplicação no gel, as concentrações de proteína das amostras foram determinadas, utilizando metodologia proposta por Bradford (1976), e todas as amostras foram equivalentemente diluídas para uma concentração de 4 mg/mL. Retiraram-se aliquotas de 10 µL dos extratos protéicos correspondentes aos diferentes tratamentos e adicionaram-se 40 µL de tampão da amostra (2,5mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de bromofenol e completado o volume para 20 mL com tampão Tris- HCl pH 7,5) Os tubos foram colocados durante 5 minutos em água em ebulição. Foram aplicados 70 µL do extrato em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo usado foi Tris-glicina + Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) pH 8,9. A corrida eletroforética foi realizada a 150 Volts e os géis corados com Prata e Comassie Blue a 0,05% conforme Alfenas et al. (1992), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%, etanol 5% e água 85%. Para a coloração com prata o gel foi colocado em metanol 50% por 5 minutos, em seguida foi lavado por 15 minutos com água ultra pura, e colocado em solução de Ditiotreitól (33µL de DTT 1M + 250 mL de água). A seguir foi colocado em solução de AgNO<sub>3</sub> (1, 5 mL de AgNO<sub>3</sub> 20% + 250 mL de água), por 15 minutos, passado esse período, foi lavado três vezes em água ultrapura e adicionado o reagente para desenvolvimento da cor por três vezes (9 g de Na<sub>2</sub>Co<sub>3</sub> + 150 microlitros de formaldeído + 300 mL de água). E ao final colocado em solução de ácido cítrico 45%.

Para estimativa dos pesos moleculares, foi aplicada em cada gel uma alíquota do padrão de proteínas, Bio-Rad Catalog 161-0344, Control 86787, contendo miosina-213.000 Daltons (azul), Beta galactosidase-135.000 Daltons (Magenta), Soro albumina bovina 85.000 Daltons (Verde), anidrase carbônica-44.100 Daltons (Violeta), inibidor de tripsina de soja-32.400 Daltons (Laranja), lisozima -18.500 Daltons (vermelho) e aptotina-8.000 Daltons (azul).

#### - **Análises de DNA**

As extrações de DNA foram efetuadas empregando-se Kit DNeasy Qiagen (1999). Foram utilizadas plântulas de algodoeiro, das variedades Precoce (Epamig-5), IAC-22, ITA-90, ITA-96 e Redenção (Epamig-4), anteriormente liofilizadas em liofilizador Modelo L4KR Edwards, por 48 horas, sob temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ , pressão  $10^{-1}$  mbar.

A concentração das amostras de DNA foi determinada com o auxílio de um fluorímetro Hoefer Scientific, modelo TKO 100, no qual foram empregadas alíquotas de  $2\ \mu\text{L}$  de amostra para cada 2mL de tampão TNE 10X (1,3% Tris-base; 0,37 %  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 11,68% NaCl- pH 7,4).

As análises de AFLP foram desenvolvidas usando o protocolo descrito no capítulo 2. A amplificação seletiva foi feita com primers *Eco RI* + 3 pares de bases e *Mse I* + 3 pares de base segundo combinação de primers descritas na Tabela 2 (Cheung, 2000).

**TABELA 2** - Combinação de primers utilizadas na análise de AFLP (Gibco BRL). UFLA, Lavras-MG, 2001.

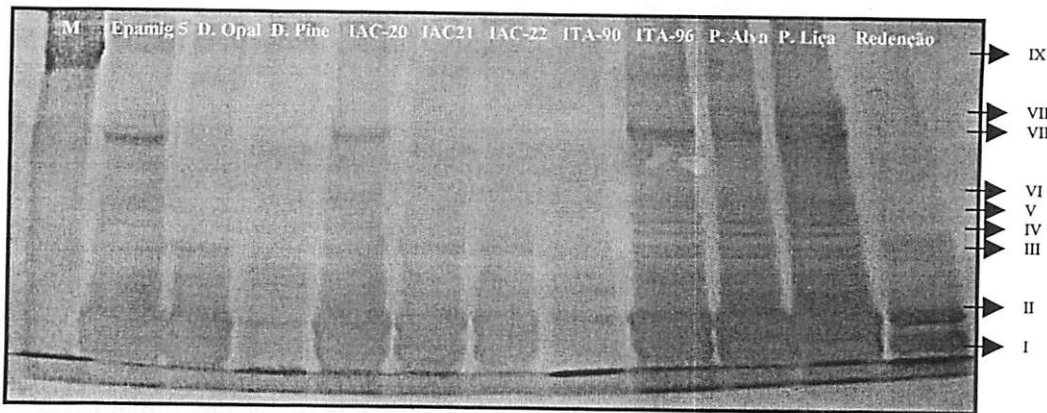
Pré Amplificação	Combinação de primers	
	<i>Eco RI</i>	<i>MseI</i>
AC	EAAC	MCAC
AC	EAAC	MCAG
AC	EAAC	MCAT
AC	EAAC	MCTT

Para a análise estatística, presença ou ausência de bandas foram usadas como dados binários para construir matrizes que foram transformadas usando o programa NTSYS-pc versão 2.1 (Rohlf, 2000) com coeficiente de similaridade Dice (1945). Um dendrograma foi construído usando método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (unweighted pair-group method with arithmetic average-UPGMA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### - Análises de Proteínas

Pelo zimograma (Figura 1) observa-se que as variedades apresentaram variações nos perfis eletroforéticos de proteínas extraídas por calor. Essas variações ocorreram tanto no número de bandas quanto na intensidade e/ou nitidez.



I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX = bandas.

**FIGURA 1** - Gel de proteínas extraídas pelo calor para diferentes cultivares de algodoeiro, coloração com prata. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Dessa forma, observa-se que as variedades de uma maneira geral foram divididas em três grandes subgrupos, com pequenas variações entre as variedades de um mesmo subgrupo, sendo essa classificação em função da presença e ausência de bandas nos perfis eletroforéticos (Figura 1). No primeiro grande subgrupo encontram-se as variedades Precoce Alva, Precoce Liça, ITA-96 e Precoce (Epamig-5) (Tabela 4). Dentro desse subgrupo, as variedades que apresentaram maior similaridade entre si para essa característica foram a Precoce Alva e a Precoce Liça. Ambas apresentaram as bandas I, II, III, IV, V, bastante nítidas, diferindo entre si apenas na intensidade das bandas VI, VII e VIII. Vale ressaltar que se trata dos dois únicos materiais semigaméticos, o que coloca esse marcador como bastante promissor para agrupar e diferenciar materiais geneticamente próximos. Apesar da alta similaridade entre os dois materiais, esse tipo de marcador foi eficiente em diferenciá-los. Também as cultivares ITA-96 e Precoce (Epamig-5), que foram agrupadas nesse grande subgrupo apresentaram-se similares entre si e entre as cultivares acima mencionadas. Observa-se, no entanto (Tabela 4), que nenhuma delas apresentou-se igual em

relação a esse marcador. A principal diferença da ITA-96 em relação às demais cultivares desse subgrupo é a banda IX presente apenas nessa última. A mesma ainda se diferencia na intensidade das bandas VI, VIII da P. Liça. Desse grupo a mais divergente foi a cultivar Precoce (Epamig-5) que não apresentou em seu padrão protéico as bandas VIII e IX. Na intensidade de banda, ela difere da P. Alva, P. Liça e ITA-96, nas bandas III, IV e V, com essas bandas presentes em intensidade intermediária. Dentro desse grupo, é a cultivar que apresenta como principal característica agrônômica a precocidade, ou seja, rápida frutificação.

No segundo subgrupo encontram-se as variedades Delta Opal, IAC-20, IAC-21, IAC-22 e Redenção, e no terceiro, a Delta Pine e a ITA-90.

Entre as variedades do segundo subgrupo, a Delta Opal e IAC-21 são as mais similares, pois ambas apresentaram as bandas I, II e III. Esse marcador diferencia as duas variedades em função da intensidade das bandas III, ou seja, enquanto a IAC-21 apresenta a banda III com intensidade intermediária, a Delta Opal apresenta essa subunidade de intensidade fraca.

Já a cultivar IAC-20 difere das demais desse subgrupo por apresentar a banda VII e em função da intensidade das demais bandas.

Já a cultivar IAC-22 difere da IAC-20 por esta última apresentar a banda VII e também em função da intensidade das três bandas, e da IAC-21 pela intensidade da banda III. Não foi possível detectar por meio desse marcador nenhuma diferença entre as variedades Delta Opal e a IAC-22, e entre as variedades Redenção e IAC-21, apesar de a Delta Opal ter como principal característica agrônômica a fibra longa e a IAC-22 e 21, a precocidade, e todas apresentam resistência múltipla a doenças.

As variedades do terceiro subgrupo, Delta Pine e ITA-90, ambas resistentes à ramulose, se apresentaram completamente diferentes das demais em relação ao caráter proteínas resistentes ao calor, apresentando as bandas I e II muito fracas, não diferiram entre si para esse caráter. É importante ressaltar que a ITA-90 foi

originária de seleção direta da Deltapine (Beltrão, 1999), e não tem ancestrais em comum com as demais. Também por meio do marcador molecular AFLP essa cultivar (ITA-90) apresentou-se como a mais divergente (49% de similaridade) em relação às demais.

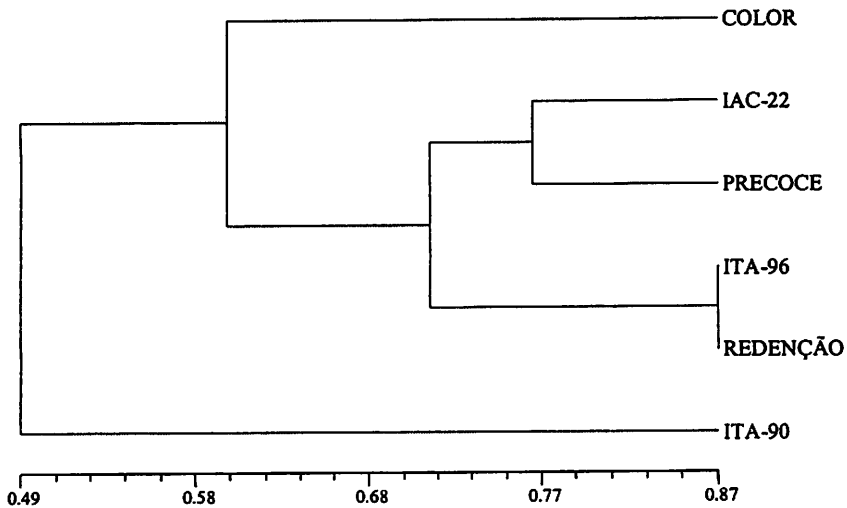
**TABELA 4** - Subunidades protéicas detectadas por eletroforese de proteínas extraídas pelo calor de algumas variedades de algodoeiro. UFLA, Lavras-MG. 2001.

Variedades	Bandas (presença)	Intensidade das bandas				Sub grupo
		Intensa	Intermediária	Fraca	Muito Fraca	
Precoce- Epamig-5	I, II, III, IV, V, VII	I, II, VII	III, IV, V			1
Delta Opal	I, II, III		I, II	III		2
Delta Pine	I, II				I, II	3
IAC-20	I, II, III, VII	I, II	III	VII		2
IAC-21	I, II, III		I, II, III			2
IAC-22	I, II, III		I, II	III		2
ITA-90	I, II				I, II	3
ITA-96	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX	I, II, III, IV, V, VII		VI, VIII, IX		1
Precoce Alva	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII	I, II, III, IV, V	VII	VI, VIII		1
Precoce Liça	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII				1
Redenção	I, II, III		I, II, III			2

Esse marcador apresenta-se polimórfico para essas variedades. No entanto, para que esse marcador seja sugerido como um descritor, investigações devem ser feitas para uma diversidade maior de genótipos, os quais devem ser produzidos sob diferentes condições, para que avalie atributos de homogeneidade, distinguibilidade e estabilidade.

## Análises de DNA

As análises de AFLP nas diferentes combinações de primers geraram um total de 400 bandas, das quais apenas 19 eram polimórficas. Isso provavelmente se deveu ao fato de esses genótipos apresentarem base genética estreita e por AFLP amplificarem regiões do genoma de forma aleatória, provavelmente regiões que foram amostradas de DNA seja mais conservado.



**FIGURA 2** - Dendrograma de similaridades entre cultivares de algodoeiro, baseado em marcadores AFLP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

A falta de diversidade caracteriza-se pelo uso contínuo nos cruzamentos de materiais descendentes de Auburn 56 e da Tamcot SP 37, ambos originários dos Estados Unidos (Beltrão, 1999). Esse fato deve ter contribuído para os marcadores moleculares de DNA do tipo AFLP, nesta pesquisa, terem se apresentado pouco informativos do ponto de vista de polimorfismo. Esses

marcadores de AFLP também podem ter amostrado somente regiões de DNA altamente repetitivo, justificando tão baixo polimorfismo. Autores como Meredith Junior (1994), enfatizam que um dos fatores limitantes no uso de marcadores moleculares em algodoeiro tem sido o custo e o baixo polimorfismo. Pelos resultados desta pesquisa concorda-se em parte com esse autor, uma vez que se encontrou pouco polimorfismo para os genótipos em questão. No entanto, cabe comentar, que esse marcador, apesar do pouco polimorfismo, foi eficiente em agrupar as duas cultivares IAC-22 e Precoce (Epamig 5), com uma similaridade de 75%. Essas cultivares apresentam a característica precocidade. As duas têm um dos ancestrais em comum: a cultivar IAC-22 é originada do cruzamento das linhagens IAC 20 X GH 1197-5, e a cultivar Precoce (Epamig 5) originou-se da linhagem americana C-25-1-80 por meio de seleções individuais de plantas em campos da referida linhagem (Falieri, J. comunicação pessoal), que por sua vez originou do cruzamento entre as linhagens GH 1197-5 X Stoneville 213 (Tabela 1).

A cultivar Color, pelos resultados gerados por AFLP, apresentou uma similaridade média com as demais de 59% (Figura 2). Trata-se de uma cultivar selecionada de uma população nativa do Nordeste Brasileiro (comunicação pessoal Fraga, A. C.), e apresenta como característica a alta desuniformidade no campo, em relação ao porte e à cor da fibra (tons variando de creme a marrom).

A cultivar ITA-90 foi a que apresentou um menor percentual de similaridade em relação às demais (49%). Esse resultado procede, uma vez que essa cultivar originou-se de seleção da Deltapine Acala-90 e não apresenta progenitores comuns com as demais cultivares (Tabela 1). A cultivar Deltapine Acala-90, é um material Norte Americano, e foi introduzido para a busca de diversidade, principalmente visando a introduzir aos materiais cultivados, alelos de resistência às principais doenças (Beltrão, 1999). Também por meio dos

perfis eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor (Figura 1), foi possível separar essa cultivar.

As cultivares IAC-22, Precoce (Epamig-5), Redenção (Epamig-4) e ITA-96, apresentaram similaridades superiores a 70%. Essa alta similaridade é devida aos parentais que as mesmas têm em comum. Todas têm característica de rápida frutificação e foram obtidas de seleções envolvendo a cultivar Tamcot SP-37, que por sua vez deu origem à cultivar GH-11-9-75 (Beltrão, 1999), material esse, genitor da maioria delas. Essas cultivares apresentaram perfis eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor bastante similares.

Pôde-se observar pelos resultados obtidos, que para as cultivares que apresentam ancestrais e algumas características em comum, foi possível detectar pelo marcador AFLP maior porcentagem de similaridade entre elas. A exemplo podem-se citar as cultivares ITA-96 e Redenção com grau de similaridade de 87% (Figura 2). Essas cultivares apresentam em comum a resistência a viroses (doença azul e vermelhão).

## 6 CONCLUSÕES

As variedades que apresentam maior similaridade por meio de marcadores de proteínas extraídas pelo calor são a Precoce Alva e a Precoce Liça, que são materiais semigaméticos.

As proteínas extraídas pelo calor apresentaram-se como marcadores promissores para agrupar e diferenciar materiais geneticamente próximos, como os empregados nesta pesquisa.

A cultivar ITA-90 é a mais divergente (49% de similaridade) detectada tanto por marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor, como moleculares do tipo AFLP.

Os marcadores moleculares de DNA do tipo AFLP se mostram pouco polimórficos para genótipos de algodoeiro, mas ainda permitem o agrupamento dos mesmos em função da genealogia.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essencias florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 292p.

ASSOCIATION OF OFICIAL SEED ANALYSTS. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371p.

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

BAKER, J.; STEELE, C.; DURS, L.I. Sequence and characterization of Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n.3, p. 277-291, 1988.

BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Algodão/Comunicação para transferência de tecnologia, 1999. v. 1, 491p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, Jan. 1976.

BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

CHEUNG, W. D. AFLP fingerprinting of *Colletotrichum* spp. Disponível em: <<http://wpi.edu/wcheung/rppaper>> Acesso em: 29 dez. 2001.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.

Dneasy Plant Mini Handbook. For DNA isolation from plant tissue. Qiagen. March, 199.16 p.

**GUIMARÃES, R. M. Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.). 2000. 180p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**IMOLESI, A. S. Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. 1999. 57p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Rules for seed testing. Switzerland, 1996. 44p.**

**JOSÉ, S. C. B. R. Condicionamento osmótico de sementes de pimentão: efeito na germinação, vigor e atividade enzimática. 1999. 107p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**KIEGEL, J.; GALILI, G. Seed development and germination. Madison, 1995. 853p.**

**MEREDITH JUNIOR, W. R. RFLP associations with varietal origin and heterosis. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 1993, Memphis. Proceedings... Memphis: National Cotton Council of America, 1992. p.607.**

**MEREDITH JUNIOR, W. R. Use of molecular markers in cotton breeding. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD RESEARCH CONFERENCE: challenging the future, 1., 1994, Brisbane. Proceedings... [S.l.: s.n.], 1994. p.303-308.**

**MULTANI, D. S; LYON, B. R. Genetic Fingerprint of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome, Ottawa, June.n.38, 1005-1008.1995**

**ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate system: version 2.10. New York, 2000.**

**SALGADO, K. C. C. Certificação da pureza genética em sementes híbridas por meio de marcadores morfológicos e moleculares. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**VIEIRA, . S. N. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética. 2000. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application n° 0534858 A1. 1993.**

✱

## CAPÍTULO 5

### ESTABILIDADE DO DESCRITOR REAÇÃO A RAMULOSE NA PROTEÇÃO E REGISTRO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO.

#### 1 RESUMO

MANN, Renata Silva. Estabilidade do descritor reação a ramulose na proteção e registro de cultivares de algodoeiro. In: \_\_\_\_\_. *Diversidade do Complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares*. 2002. Cap.5 Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

A reação à ramulose tem sido empregada como um descritor para a proteção e registro de cultivares de algodoeiro. Nesse sentido objetivou-se com este trabalho estimar a Capacidade Específica de Interação (CEI) e a capacidade Geral de Reação (CGR), a Capacidade Geral de Agressividade (CGA) por meio de testes de patogenicidade de plantas inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, visando a detectar o tipo de resistência que envolve essa relação, com vistas a avaliar a estabilidade da variável reação à ramulose em algodoeiro. A presente pesquisa foi realizada em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da UFLA. Em um primeiro experimento empregaram-se 5 cultivares (Precoce-Epamig-5), IAC-22, Redenção-Epamig-4, ITA-96 e ITA-90) e quatro isolados (CA-12, CA-1, Cgc1, Cgc5). No segundo experimento empregaram-se as mesmas cultivares e oito isolados (10166, 11327, 11086, 11326, CR5, 6236, 6727, 3564). As sementes das cultivares foram semeadas em vaso, e aos 30 dias após a emergência foram inoculadas com suspensões de conídios ( $10^6$  conídios/mL), e deixadas em câmara úmida por 72 horas. As avaliações dos sintomas foram realizadas aos 10 e 40 dias após a inoculação. Para estimativa da resistência empregou-se metodologia sugerida por Melo & Santos (1999), modelo de Griffing com esquema de dialelo parcial. No primeiro experimento a CGR, CGA e CEI apresentaram significância ao nível de 1% de probabilidade, evidenciando a existência de variabilidade entre o nível de resistência horizontal e a agressividade dos isolados. No segundo experimento a CEI apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade,

---

\*Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

evidenciando comportamentos específicos das cultivares quando em associação com diferentes isolados. A cultivar Precoce, apresentou-se como a de maior resistência horizontal, seguida pelas IAC-22 e ITA-90. As cultivares Redenção e ITA-96 apresentaram menor resistência horizontal à ramulose. A cultivar Redenção apresentou resistência vertical para o isolado CA-1, a cultivar Precoce para o isolado 6727, e a cultivar IAC-22 para o isolado 11086 e CA-12. Houve diferença na agressividade entre os isolados, sendo os isolados Cgc1, Cgc5, CR5, 3564, 10166 e 11326 os que se apresentaram mais agressivos. Pelos resultados, constatou-se que a reação à ramulose varia em função do isolado e da cultivar. Portanto, a forma como o descritor reação à ramulose vem sendo empregado deve ser avaliada, principalmente quando se visa à proteção e registro de cultivares.

---

**\*Comitê Orientador:** Dra. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

## 2 ABSTRACT

MANN, Renata Silva. Assessment of describer stability reaction to ramulose in cotton. In: \_\_\_\_. Diversity of the *Colletotrichum* complex and cotton cultivars by molecular markers. 2002. Cap.5 Thesis (Doctor degree in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

Reaction to ramulose has been used as a describer for cotton cultivar protection and registration. The objective of this study was to estimate the Specific Interaction Ability (SIA) and the General Reaction Ability (GRA) the General Aggressivity Ability (GAA) by the pathogenicity of plants inoculated with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, to detect the type of resistance that involves this relationship to assess the stability of the variable reaction to ramulose in cotton. The present research was carried out in a greenhouse at the UFLA Department of Agriculture. Five cultivars were used in the first experiment (Precoce-Epamig-5, IAC-22, Redenção-Epamig-4, ITA-96 and ITA-90) and four isolates (CA-12, CA-1, 10166, Cgc5). In the second experiment the same cultivars and eight isolates (10166, 11327, 11086, 11326, CR5, 6239, 6727, 3564) were used. The seeds of the cultivars were sown in pots and inoculated 30 days after emergence with conidial suspensions ( $10^6$  conidia/mL) and left in a damp chamber for 72 hours. The symptoms were assessed 10 and 40 days after inoculation. Resistance was estimated by methodology suggested by Melo & Santos (1999), the Griffing model with partial diallel scheme. In the first experiment GRA, GAA and SIA presented significance at 1% probability showing variability among the horizontal resistance level and the aggressiveness of the isolates. In the second experiment the SIA presented significance at 1% level of probability, showing specific behavior of the cultivars when in association with different isolates. The Precoce cultivar was the most horizontally resistant, followed by IAC-22 and ITA-90. The Redenção and ITA-96 cultivars presented least horizontal resistance to ramulose. The Redenção cultivar presented vertical resistance to the CA-1 isolate, the Precoce cultivar to the 6727 isolate and the IAC-22 cultivar to the 11086 and CA-12 isolate. The aggressiveness was different among the isolates and the Cgc1, Cgc5, CR5, 3564 10266 and 11326 isolates were the most aggressive. The reaction to ramulose varied depending on the isolate and the cultivar. Thus the way the ramulose

---

**\*Guidance Committee:** Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

reaction describer is employed should be assessed, especially for cultivar protection and registration.

---

**\*Guidance Committee:** Dr. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr. José da Cruz Machado – UFLA, Dr. Mikel Ross Stevens – Brigham Young University, Dr. Antônio Carlos Fraga – UFLA.

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura do algodoeiro (*Gossypium hiirsutum* L.) representa para o Brasil uma das mais importantes opções no âmbito da Agricultura, não somente por produzir matéria prima natural para a indústria têxtil, como também pela utilização dos seus subprodutos para outras finalidades, como na alimentação animal e na obtenção de óleo de caroço de algodão. Ressalta-se também a grande importância dessa cultura do ponto de vista social.

Uma das principais doenças fúngicas associada a cultura do algodoeiro é a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa, que foi detectada pela primeira vez no Brasil, em 1936, no Estado de São Paulo (Costa, 1941).

Um aspecto de grande importância dessa doença é a possibilidade de transmissão de seu agente etiológico via semente, apresentando o risco de introduzir o patógeno em áreas não contaminadas (Lima et al., 1985).

A reação à ramulose tem sido empregada como um descritor para a proteção e registro de cultivares de algodoeiro (BRASIL, 1997). A grande variação encontrada nos descritores sugeridos despertam questionamentos para a estabilidade desses, pois para serem empregados com sucesso devem atender aos requisitos de homogeneidade, estabilidade e distinguibilidade.

Para o descritor reação à ramulose, têm sido encontradas variações que algumas vezes são sugeridas ocorrer em face das condições de cultivo, como por exemplo a fertilidade do solo e as condições climáticas. No entanto, parece ser importante o fator ligado à resistência das variedades cultivadas, e ao controle genético envolvido nessa resistência. Cia e colaboradores (1999) mencionaram a instabilidade da maioria dos genótipos de algodoeiro, diante das diversas doenças indicando a necessidade de melhoramento genético para resistência múltipla a doenças. Essa informação pode ser acessada pelas avaliações das

diferentes cultivares quando inoculadas com diferentes isolados. Informações que reflitam o comportamento distinto das variedades e o grau de agressividade do agente causal ou grau de favorecimento das condições do ambiente seriam fatores importantes, os quais permitiriam a avaliação da resistência horizontal e vertical para esse descritor.

Segundo Freire et al (1997) as cultivares de algodoeiro Deltapine Acala-90, CNPA ITA-90 e CNPA ITA-96, são reação à ramulose, e Carvalho et al. (1988) apontam para a reação à ramulose como sendo controlada por um par de genes, sendo a susceptibilidade parcialmente dominante. Pesquisas avaliando a estabilidade da produção de genótipos de algodoeiro diante da ocorrência de doenças demonstraram que o melhor desempenho foi observado para a cultivar IAC 20, e que a cultivar Deltapine Acala-90 mostrou-se a menos estável (Fuzatto et al., 1994).

No entanto, poucos têm sido os trabalhos sobre o controle genético da reação à ramulose (Carvalho et al, 1994), e sobre a estabilidade desta característica quando avaliada perante a diversidade de genótipos fúngicos que ocorrem na natureza.

Dessa forma objetivou-se com este trabalho estimar a capacidade específica de interação e a capacidade geral de reação, bem como a capacidade geral de agressividade por meio de testes de patogenicidade de plantas inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, visando a detectar o tipo de resistência que envolve essa relação, com vistas a avaliar a estabilidade da variável reação à ramulose como descritor fisiológico para proteção e registro de cultivares de algodoeiro.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, onde foram conduzidos experimentos em casa de vegetação. No primeiro experimento foram empregadas 5 cultivares (Precoce-Epamig-5, IAC-22, Redenção-Epamig-4, ITA-96, ITA-90) (Tabela 1), e quatro diferentes isolados (CA-12, CA-1, Cgc1, Cgc 5) (Tabela 2). No segundo experimento foram empregadas as mesmas cultivares, e 8 isolados (10166, 11327, 11086, 11326, CR5, 6239, 6727, 3564) (Tabela 2).

As sementes relativas a cada cultivar foram semeadas em vaso (2 plantas/vaso). Cada vaso continha aproximadamente 3 kg de solo. Foi efetuada uma adubação corretiva, de macro (P, K, N, Mg) e micronutrientes (Cu, B, Mo, Zn). A adubação foi feita antes da semeadura, quando foram colocados 20 mL da solução de micronutrientes juntamente com 6 g de super simples em cada vaso. Após 30 dias foi realizada a adubação de cobertura com 20 mL de solução por vaso, contendo 35 g de nitrato de potássio em 200 mL de água.

**TABELA 1** - Procedência dos isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, utilizados nos ensaios com *Gossypium hirsutum*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Isolado	Procedência	Hospedeiro
10166	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> – haste
11327	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> – haste
11086	Piracicaba-SP	<i>Euphorbia heterofilla</i> L.-ponteiro
11326	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> -hastes
CR5	Ituverava-SP	<i>G. hirsutum</i> -hastes
6239	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> -hastes
6727	Piracicaba-SP	<i>Bidens pilosa</i> -hastes
3564	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> -hastes
CA12	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> -IAC 21
CA1	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i>
Cgc 5	Andirá-PR	<i>G. hirsutum</i> -sementes-IAPAR 71-PR3
Cgc1	Piracicaba-SP	<i>G. hirsutum</i> -hastes

O cultivo dos isolados foi realizado em meio BDA (extrato de 250 g de batata-20 g de dextrose-20 g de ágar). Foram preparadas suspensões de conídios com água esterilizada, as quais tiveram suas concentrações ajustadas para 10<sup>6</sup> conídios/mL, usando câmara de Neubauer. As suspensões de inóculo foram aplicadas em plantas, 30 dias após a germinação, e deixadas em câmara úmida por 72 horas. Os vasos contendo cada tratamento foram isolados por uma cobertura plástica, para evitar contato entre plantas inoculadas com diferentes isolados.

**TABELA 2** - Cultivares de algodoeiro utilizadas nos ensaios, e sua resistência à ramulose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Cultivares	Resistência a ramulose*
Precoce (Epamig5)	Moderada resistência a ramulose
IAC-22	Moderada resistência a ramulose
Redenção (Epamig-4)	Moderada resistência a ramulose
ITA-96	Resistente a ramulose
ITA-90	Resistente a ramulose

\*Fonte: Beltrão (1999)

As avaliações dos sintomas foram realizadas aos 10 e 40 dias após a inoculação, segundo a Tabela de severidade sugerida por Cia (1977), com adaptações (Tabela 3).

Para estimativa da resistência foi empregada metodologia sugerida por Melo e Santos (1999), empregando o modelo de Griffing (1954), com esquema de dialelo parcial por Geraldi & Miranda Filho (1988). Conforme simulação realizada pelos autores, o dialelo parcial foi empregado fazendo uma adaptação na metodologia, em que um grupo é formado por hospedeiros e o outro, por patógenos.

**TABELA 3** - Critérios utilizados para avaliação dos sintomas da ramulose em plantas de algodoeiro, inoculadas com isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

SINTOMAS	NOTA
Planta sem sintoma (ausência de lesões).....	1
Plantas com manchas estreladas nas folhas do ponteiro.....	2
Planta com redução dos internódios inferior a 40%, quando comparada com a testemunha e com manchas foliares circulares e estreladas.....	3
Planta com superbrotamento e redução no porte em 40 a 60%, quando comparada com a testemunha.....	4
Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido; redução do porte superior ou igual a 60%.....	5

A capacidade geral de reação do hospedeiro (CGR), que representa a resistência horizontal (RH), depende da performance média do hospedeiro nas inoculações com diferentes isolados do patógeno. Da mesma forma a capacidade geral de agressividade do patógeno (CGA), representada pela média da patogenicidade de cada isolado quando inoculado com todos os genótipos de hospedeiros. A interação entre os isolados do patógeno e os genótipos do hospedeiro corresponde à Capacidade Específica de Interação (CEI) entre os

componentes dos dois grupos, que representa a Resistência Vertical (RV). Dessa forma, essas estimativas poderão representar a agressividade do patógeno, e também a resistência vertical dos genótipos dos hospedeiros (Melo & Santos, 1999) (Tabela 4).

**TABELA 4** - Modelo da análise de variância para o dialelo parcial, envolvendo as combinações de isolados *versus* hospedeiros. UFLA, Lavras-MG, 2001.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Cultivares (RH)	C-1	Q1	Q1/Q4
Isolados (AH)	R-1	Q2	Q2/Q4
Cult.X Isolados	(C-1)(R-1)	Q3	Q3/Q4
<b>Erro</b>		Q4	

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise dialélica (Tabela 5), do primeiro experimento (Ano 1999), em que foram envolvidas 5 variedades de algodoeiro e 4 isolados do Complexo *Colletotrichum* observou-se que a Capacidade Geral de Resistência, Capacidade Geral de Agressividade e Capacidade Específica de Interação apresentaram significância ao nível de 1% de probabilidade. Isso evidencia a existência de variabilidade entre o nível de resistência horizontal e a virulência dos isolados, bem como a existência de Resistência Vertical. Segundo Van der Plank (1963), quando a interação entre os isolados do patógeno e cultivares dos hospedeiros é significativa (Tabela 5), trata-se de Resistência Vertical.

No entanto, para o segundo experimento (Ano 2000) em que foram envolvidas 5 variedades de algodoeiro e 8 isolados do Complexo *Colletotrichum*, somente a capacidade específica de interação apresentou significância ao nível de 1% probabilidade (Tabela 5).

Isso evidencia a existência de variabilidade de Resistência Vertical, ou seja, comportamentos específicos das cultivares quando em associação com diferentes isolados. Empregando-se testes de patogenicidade nem sempre se consegue discernir com clareza, quais são os patógenos envolvidos na sintomatologia e ramulose (Chitarra, 1996), por causa de variações na agressividade dos isolados (Dudienas 1990; Tanaka, 1990 e Tanaka & Menten, 1991).

**TABELA 5** - Resumo da análise de variância do esquema dialélico para severidade aos 40 dias de inoculação, das cultivares de algodoeiro, inoculadas com diferentes isolados do complexo *Colletotrichum*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Ano 1999		
Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
CGR (Resistência Horizontal)	4	4,106*
CGA (Agressividade)	3	20,466*
CEI (Resistência Vertical)	12	3,039*
Erro	60	0,025
Ano 2000		
CGR (Resistência Horizontal)	4	1,020 n.s.
CGA (Agressividade)	7	2,571*
CEI (Resistência Vertical)	28	2,111**
Erro	40	0,8999

Esta variabilidade de comportamento dentro de uma cultivar, quando em associação com diferentes isolados fúngicos tem sido descrita por Burkle et al. (1999), os quais observaram reação variável de um isolado agressivo para 31 diferentes cultivares de algodoeiro, o que caracterizou a ocorrência de desvio padrão alto nas análises estatísticas.

Observa-se pelos resultados (Tabelas 6 e 7) que as cultivares diferiram entre si quanto à resistência horizontal. As cultivares Redenção e ITA-96 apresentaram-se como as mais susceptíveis ao *Colletotrichum*, ou seja como as de menor Resistência Horizontal (Tabelas 6 e 7). Aos 10 dias de avaliação as 2

cultivares não diferiram entre si em relação a sintomatologia (Tabela 6). No entanto, por ocasião da avaliação aos 40 dias após a inoculação a cultivar ITA-96, apresentou-se como a de menor resistência horizontal (Tabela 7). Independente da época de avaliação, a cultivar que apresentou maior grau de resistência horizontal para *Colletotrichum* foi a Precoce (Epamig-5) (Tabelas 6 e 7), seguida da IAC-22 e ITA-90, sendo que as duas últimas foram estatisticamente iguais entre si.

**TABELA 6** - Estimativa da Capacidade de resistência (resistência horizontal) para a severidade da ramulose aos 10 dias da inoculação, das cultivares de algodoeiro inoculadas com diferentes isolados do Complexo *Colletotrichum*. (Ano 1999). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Cultivares de algodoeiro	CGR (severidade)
Precoce	-0,587
IAC-22	-0,150
Redenção	0,474
ITA-96	0,412
ITA-90	-0,150
DMS ( $G_i$ )	0,050
DMS ( $G_i-G_j$ )	0,079

Em relação a Capacidade Geral de Agressividade observa-se pelas Tabelas 8 e 9, que o isolado Cgc1, descrito como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, foi o mais agressivo pela sintomatologia em plantas de algodoeiro, tanto aos 10 como aos 40 dias de avaliação. Esse isolado apresentou sintomas bastante característicos nas folhas, encurtamento dos internódios e redução do porte entre 40 a 60%.

**TABELA 7-** Estimativa da Capacidade de Resistência (Resistência Horizontal) para severidade da ramulose às cultivares de algodoeiro inoculadas com diferentes isolados do complexo *Colletotrichum*, avaliadas aos 40 dias de inoculação (Ano 1999). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Cultivares de algodoeiro	CGR
Precoce	-0,637
IAC-22	-0,200
Redenção	0,487
ITA-96	0,549
ITA-90	-0,200
DMS ( $G_i$ )	0,035
DMS ( $G_i - G_j$ )	0,055

O segundo mais agressivo foi Cgc5, que tanto aos 10 quanto aos 40 dias de avaliação apresentou sintomas típicos para ramulose (Tabelas 8 e 9).

Apesar de esses isolados apresentarem-se heterogêneos entre si em relação à agressividade, pelos dados gerados pela análise de AFLP (Capítulo 2 e 3) eles apresentaram uma proximidade de 69, 47%.

Em relação aos dois isolados que apresentaram-se menos agressivos, ou seja apresentaram sintomas mais característicos de antracnose tanto pelas avaliações aos 10 quanto aos 40 dias, apesar de diferirem estatisticamente dos demais, foram iguais entre si, quanto à agressividade.

Para o segundo experimento (Ano 2000), os isolados que se mostraram mais agressivos, aos 10 dias da inoculação, foram CR5, 3564, 10166 e 11326 (Tabela 8). Esses isolados apresentaram 97,21% de similaridade, pelo estudo de marcadores AFLP (Capítulo 3). Pelos dados de sintomatologia aos 40 dias, os isolados mais agressivos foram CR5, 3564, 10166, 11326 (Tabela 9).

**TABELA 8** - Estimativas da Capacidade Geral de Agressividade para severidade da ramulose, aos 10 dias de inoculação para cultivares de algodoeiro inoculadas com diferentes isolados do complexo *Colletotrichum*. UFLA, Lavras-MG. 2001.

Ano 1999	
Isolados	CGA (severidade)
CA-12	-0,850
CA-1	-0,950
Cgc1	1,199
Cgc5	0,599
DMS ( $G_i$ )	0,043
DMS ( $G_i-G_j$ )	0,070
Ano 2000	
Isolados	CGA (severidade)
10166	0,337
11327	-0,462
11086	-0,962
11326	0,237
CR5	0,737
6239	0,137
6727	-0,562
3564	0,537
DMS ( $G_i$ )	0,270
DMS ( $G_i-G_j$ )	0,409

Esses isolados, pela análise de similaridade obtida pelos dados de AFLP, mostraram-se estreitamente relacionados (similaridade em média superior a 95%). Assim, mesmo mostrando um estreito relacionamento pela avaliação por meio de marcadores moleculares do tipo AFLP, esses microrganismos quando em associação com diferentes cultivares de algodoeiro, apresentaram comportamento distinto. Esse fato permite inferir sobre a diferença de comportamento das cultivares para os diferentes isolados, que deve ser levada em consideração quando se avalia resistência, e que nesta pesquisa foi constatada pela estimativa da Capacidade Específica de Interação (CEI).

Outro aspecto a ser mencionado é que quando se trata de isolados causadores de antracnose eles são mais homogêneos entre si para agressividade do que os causadores da ramulose, quando se avalia a sintomatologia (Tabela 9). No entanto, quando se empregam marcadores AFLP, os causadores da antracnose são mais divergentes entre si do que os da antracnose (Capítulo 2 e 3).

**TABELA 9** - Estimativas da Capacidade Geral de Agressividade, para severidade da ramulose, aos 40 dias da inoculação, das cultivares de algodoeiro inoculadas com diferentes isolados do complexo *Colletotrichum*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Ano 1999	
Isolados	CGA
CA-12	-0,850
CA-1	-0,850
10166	1,149
Cgc5	0,549
DMS ( $G_i$ )	0,030
DMS ( $G_i - G_j$ )	0,050
Ano 2000	
Isolados	CGA
10166	0,400
11327	-0,600
11086	-0,200
11326	0,300
CR5	0,700
6239	-0,500
6727	-0,500
3564	0,400
DMS ( $G_i$ )	0,280
DMS ( $G_i - G_j$ )	0,424

Estimativas da Capacidade Específica de Interação indicam o nível de resistência Vertical das cultivares em relação à virulência dos isolados (Tabelas 10 e 11), verifica-se que as cultivares Precoce e IAC-22, descritas na literatura,

como cultivares de resistência intermediária à ramulose (Tabela 2) apresentaram Resistência Vertical apenas ao isolado Cgc5 enquanto a cultivar ITA-90, descrita como resistente à ramulose (Tabela 2), apresentou Resistência Vertical apenas para o isolados CA-12 e 10166, ambos causadores de ramulose. Observa-se na avaliação efetuada aos 10 dias (Tabela 8), já foi possível detectar esse tipo de resistência. Por outro lado, apesar de as cultivares IAC-22 e Redenção, descritas como apresentando Resistência Intermediária à ramulose (Tabela 2), apresentaram Resistência Vertical aos isolados CA-12, quando da avaliação aos 10 dias (Tabela 8). As cultivares IAC-22, ITA-96 e Redenção apresentaram esse tipo de resistência para esse isolado quando da avaliação dos sintomas aos 40 dias de inoculação (Tabela 11).

**TABELA 10-** Estimativas da Capacidade Específica de Combinação (CED) resultantes da interação entre as cultivares de algodoeiro e os isolados do complexo *Colletotrichum*, com relação à severidade da doença, avaliada aos 10 dias após a inoculação (Ano 1999). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Variedades	Isolados			
	CA-12	CA-1	Cgc1	Cgc5
Precoce	0,037	0,387	0,987	-1,412
IAC-22	-0,399	0,700	0,550	-0,849
Redenção	-0,274	-0,174	-0,074	0,525
ITA-96	0,037	-0,612	-0,012	0,587
ITA-90	0,600	-0,299	-1,449	1,150
DMS ( $S_{ij}$ )	0,086			
DMS ( $S_{ij} - S_{ik}$ )	0,141			
DMS ( $S_{ijm} - S_{kj}$ )	0,136			
DMS ( $S_{ij} - S_{kl}$ )	0,117			

Para o segundo experimento, a cultivar Precoce (Epamig-5) apresentou Resistência Vertical para o isolado 6727, que foi obtido de plantas de *Bidens pilosa*, e a cultivar IAC-22 para o isolado 11086 (Tabela 11). Esses isolados pela análise de AFLP mostram similaridade de 97,50%. Apesar dessa proximidade,

os mesmos mostraram comportamentos diferenciados para patogenicidade em plantas de algodoeiro.

**TABELA 11** -Estimativas da Capacidade Específica de Combinação (CEI) resultantes da interação entre as cultivares de algodoeiro e os isolados do complexo *Colletotrichum*, com relação a severidade da doença, avaliada aos 40 dias após a inoculação. UFPA, Lavras-MG, 2001.

Ano 1999								
Cultivares	CA12	CA1	10166	Cgc5				
Precoce	0,037	0,287	1,037	-1,362				
IAC-22	-0,399	0,600	0,600	-0,799				
Redenção	-0,087	-0,337	-0,087	0,512				
ITA-96	-0,149	-0,149	-0,149	0,450				
ITA-90	0,600	-0,399	-1,399	1,200				
DMS (S <sub>ij</sub> )	0,061							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>ik</sub> )	0,100							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>kl</sub> )	0,096							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>kl</sub> )	0,082							
Ano 2000								
	10166	11327	11086	11326	CR5	6239	6727	3564
Precoce	-0,212	1,287	-0,112	1,387	-0,013	0,688	-1,812*	-1,212
IAC-22	0,288	-1,212	0,888	-2,112*	0,487	-0,312	-0,688	1,288
Redenção	-0,275	-0,275	-1,175	-0,675	0,075	1,125	1,125	0,225
ITA-96	-0,275	0,725	-0,175	1,325	0,425	-0,875	-0,875	-0,275
ITA-90	0,475	-0,525	0,575	0,075	-0,825	-0,625	0,875	-0,025
DMS (S <sub>ij</sub> )	0,561							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>ik</sub> )	0,848							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>kl</sub> )	0,779							
DMS (S <sub>ij</sub> -S <sub>kl</sub> )	0,744							

O caráter resistência à ramulose tem sido utilizado como marcador fisiológico no processo de proteção e certificação de cultivares de algodoeiro. No entanto, pelos resultados encontrados na presente pesquisa, a forma como ele tem sido utilizado pode levar a erros na caracterização de uma determinada cultivar. Pois, apenas encontram-se na literatura classificações para a resistência à ramulose: altamente resistente, moderadamente resistente, moderadamente susceptível, susceptível e altamente susceptível. Entretanto, como pode-se ver pelos resultados, as cultivares Precoce (Epamig-5) e ITA-90, descritas na

literatura, como apresentando resistência intermediária e tolerante, apresentaram comportamento variado em função do isolado, e que a cultivar IAC-22, apresentou resistência vertical ao isolado Cgc 5, mas não ao isolado 10166. Dessa forma em um campo, onde prevalece o isolado Cgc 5, ela se apresentará resistente à ramulose. Por outro lado, num campo onde prevalece o isolado 10166 ela será susceptível à ramulose, no entanto, trata-se da mesma cultivar. Isso também aconteceu para a cultivar IAC-22 que é considerada moderadamente resistente à ramulose. Dessa forma, nesta pesquisa, apesar de ter sido efetuada com poucos isolados, demonstrou-se a necessidade de avaliações mais profundas e precisas sobre a resistência à ramulose das cultivares recomendadas para plantio, antes de sua inclusão como um descritor. Para eles serem incluídos como descritores deveria existir uma avaliação precisa do comportamento de cada cultivar em relação aos diferentes isolados do complexo *Colletotrichum*.

Os resultados dos dois experimentos, demonstraram a necessidade em se ampliarem os estudos relacionados à resistência do algodoeiro à ramulose. Pela complexidade do genoma das cultivares de algodoeiro, e dos fungos em questão, percebe-se a necessidade de se reavaliar a forma como se tem focado a certificação e o registro de proteção de cultivares utilizando esse descritor.

## 6 CONCLUSÕES

A cultivar Precoce (Epamig-5), apresenta-se como a de maior resistência horizontal, seguida pelas cultivares IAC-22 e ITA-90.

As cultivares Redenção e ITA-96 apresentam menor resistência horizontal à ramulose.

A cultivar Redenção apresenta resistência vertical para o isolado CA-1, a cultivar Precoce para o isolado 6727, e a cultivar IAC-22 para o 11086 e CA12.

A resistência horizontal é superestimada pelos valores da resistência vertical.

Existe diferença na agressividade/virulência entre os isolados *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Os isolados Cgc1, Cgc5, CR5 , 3564, 10166 e 11326 apresentaram-se como os mais agressivos/virulentos.

A resistência à ramulose varia em função do isolado e da cultivar, o que inviabiliza sua utilização como marcador fisiológico para proteção e registro de cultivares nas atuais circunstâncias.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de Proteção de cultivares. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, n. 79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção 1.

CARVALHO, L. P.; CRUZ, C. D.; MORAIS, C. F. de; LIMA, E. F. Hereditariedade da resistência do algodoeiro à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 41, n. 235, p. 254-262, 1994.

CARVALHO, L. P. DE; LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F. C. DE; MOREIRA, J. DE<sup>a</sup> N. Herança da resistência à ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 10-15, 1988.

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

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 3 (3): 167-193, 1977.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; PIZZINATO, M. A.; PETTINELLI JR., A.; PAULO, E. M.; ZIMBACK, L.; SILVA, M. A.; BORTOLETTO, N.; VASCONCELOS, A. S. A. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: **Anais: II Congresso Brasileiro de Algodão**, Ribeirão Preto, setembro, p.441-443, 1999.

COSTA, A. S. **Investigações sobre a ramulose: Relatório**. Campinas, Inst. Agr. Campinas, 1941. 49p. (Secção de algodão).

FREIRE, E. C.; SOARES, J. J.; FARIAS, F. J. C.; ARANTES, E. M.; ANDRADE, F. P. de; PARO, H.; LACA-BUENDIA, J. P. **Cultura do Algodoeiro no Estado de Mato Grosso**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1997. 65 p (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 23).

FUZATTO, M. G.; CIA, E.; CHIAVEGATO, E. J. Estabilidade da produção de genótipos de algodoeiro em face da ocorrência de doenças e nematóides. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 47-52, novembro. 1994.

GERALDI, I. O. AND MIRANDA-FILHO, J. B. Adapted models for analysis of combining ability of varieties in partial diallel crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 11, p.431-440, 1988.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biology and Science**, v. 9, p. 463-493, 1954.

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

MELO, L. C.; SANTOS, J.B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n.4, p. 601-608, 1999.

VAN der PLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and control**. Academic Press, New York, 1963, 349 p.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Pesquisas como as realizadas nesta tese, não têm sido efetivamente realizadas em microrganismos como os do Complexo *Colletotrichum* encontrados no algodoeiro. Essa se faz necessária, uma vez que os programas de melhoramento em algodoeiro têm como objetivos aumentar a produção, via elevação da produtividade, percentagem e qualidade de fibra, e redução de custos e riscos, por meio da melhor adaptação e tolerância das cultivares a doenças de maior importância. Para isso, o trabalho conjunto de fitopatologistas, tecnologistas de sementes e melhoristas é fundamental. Faz-se necessário o conhecimento cada vez maior da informação contida no DNA da planta. Parte desse empenho já foi obtido com os trabalhos pesquisando a transmissão desses por sementes, patogenicidade (Tanaka, 1990; 1995; Cia, 1977), e ainda esforços em se distinguir *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Dudienas, 1990; Vieira, 1996; Chitarra, 1996; Tanaka, 1996; Silva-Mann et al., 2002).

Muita informação já tem sido publicada, no entanto, a necessidade de continuidade dessa investigação é cada vez mais crescente.

Nesse âmbito 4 trabalhos de pesquisa foram conduzidos. No primeiro Capítulo foi relatado o referencial teórico. No Segundo Capítulo, a eficiência dos marcadores moleculares do tipo AFLP foi constatada, para a diferenciação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, ou seja, isolados típicos causadores da ramulose em algodoeiro. As bandas que permitiram essa diferenciação podem ser usadas na construção de primers específicos, os quais poderão auxiliar fitopatologistas na caracterização de isolados em lotes de sementes contaminadas, auxiliando na diagnose precisa desses patógenos, o que permitiria um controle mais efetivo e consequentemente redução das perdas produzidas por doenças. No entanto, vale ressaltar, que os isolados apresentavam-se bem típicos para as características

morfológicas e patogenicidade, o que pode ter contribuído para a perfeita distinção desses, por meio dos padrões de bandas de AFLP. A dinâmica de investigação de microrganismos tem crescido, e isso sugere a continuidade do estudo de regiões genômicas para esses patógenos, incluindo regiões que possam ser amostradas e que permitam identificar os causadores da ramulose independente do seu grau de virulência.

Em um terceiro Capítulo, os mesmos primers empregados para a diferenciação dos referidos patógenos foram usados em 49 isolados oriundos de diferentes hospedeiros e localidades. Esses não permitiram separar, como no primeiro Capítulo, os microrganismos que apresentavam características morfológicas e diferentes graus de virulência. Esse fato não indica que o uso de marcadores moleculares visando a diferenciação se invalida, mas contribui para esclarecimentos sobre os níveis de virulência, os quais podem ser classificados em escala contínua, e que outras regiões podem ser amostradas para a detecção desses microrganismos.

No quarto Capítulo, foco maior foi dado para a certificação e proteção de variedades de algodoeiro. Os marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor e marcadores moleculares de DNA tipo AFLP foram empregados. Esses últimos apresentaram baixo polimorfismo, e foram avaliados por um reduzido número de combinações de primers, o que poderia contribuir para uma não eficiência na análise, mas mesmo assim foram informativos e mostraram agrupamentos em função da genealogia para os genótipos empregados. O uso dos marcadores bioquímicos de proteínas extraídas pelo calor se mostrou promissor, e apresentaram um polimorfismo para as diferentes cultivares. Esse fator é essencial quando se analisa genótipos de base genética estreita, que é o caso das cultivares de algodoeiro que tem sido usadas para plantio no Brasil.

Esse marcador abre perspectivas que poderão contribuir para a avaliação de genótipos e ainda para a seleção assistida por marcadores. No entanto, ainda

existe a necessidade de se testar a estabilidade desse marcador, considerando diferentes condições de região de plantio, de armazenamento das sementes, e de manejo das lavouras.

No quinto Capítulo foi estimada a Resistência Vertical e Horizontal para cultivares de algodoeiro, quando em associação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A reação de plantas a esse patógeno tem sido usada para a certificação, registro e proteção de cultivares, juntamente com vários descritores morfológicos. No entanto, estudos demonstram a pouca estabilidade desse descritor, e que nessa pesquisa foi confirmada. Os resultados ainda permitiram a constatação de que, a forma como esse descritor vem sendo usado deve ser reavaliada, pela grande variabilidade de patógenos que podem ter comportamentos distintos para as diferentes cultivares, dependendo da região e do modo de propagação dos mesmos.

Essas pesquisas além de contribuir para aspectos relacionados a qualidade de sementes permitem perspectivas futuras para novos estudos visando a continuidade desses trabalhos em aspectos da mais diversa natureza. Desde a avaliação da influência nos métodos de preservação de microrganismos na variabilidade dos fungos, até as relações das associações desses com plantas. Outro fator a ser pesquisado é a existência ou não de uma especificidade entre isolados de sementes e de plantas. Aliando-se a esses trabalhos de pesquisa surge ainda a necessidade de se pesquisar sobre a resposta de plantas quando em associação com esses microrganismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHITARRA, G. S. Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 3, n. 3, p. 167-193, maio/jul. 1977.
- DUDIENAS, C. Caracterização morfológica, auxonográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. 1990. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- TANAKA, M. A. S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. 1990. 111p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- TANAKA, M. A. S. Problemas da detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.) **I Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p.93-108. 1995.
- TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.2, p.125, 1988.
- TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de método de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.15, n. 3/4, p. 219-225, jul./dez. 1991.
- TANAKA, M.A. S. Problemas da detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.) **I Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p.93-108. 1995.

**VIEIRA, M. G. G. C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro. 1996. 129p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

## ANEXOS

### ANEXO A

TABELA 1A	Estimativas de similaridades genéticas (%) (método Dice) entre 23 isolados do complexo <i>Colletotrichum</i> em algodoeiro, baseadas em dados AFLP.....	1
-----------	---	---

**TABELA 1A** – Estimativas de similaridades genéticas (%) (método Dice) entre isolados do complexo *Colletotrichum* em algodoeiro, baseadas em dados de AFLP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

	Cgc1	Cgc2	Cgc2.7	Cgc3	Cgc4	Cgc5	Cgc6	Cgc8	Cgc9	Cgc10.1	Cgc11	Cgc12	Cgc14	Cgc15
Cgc1	100.0													
Cgc2	68.80	100.0												
Cgc2.7	66.10	81.03	100.0											
Cgc3	61.50	74.80	68.22	100.0										
Cgc4	70.42	76.86	78.67	81.63	100.0									
Cgc5	69.47	76.58	77.65	81.35	99,03	100,0								
Cgc6	71.47	76.36	76.70	79.73	91,43	90,51	100,0							
Cgc8	71.88	75.47	77.32	82.47	91,15	90,20	91,02	100,0						
Cgc9	70.51	76.70	79.15	85.24	90,28	90,00	90,80	90,51	100,0					
Cgc10.1	69.59	72.86	75.35	79.74	88,75	88,47	90,52	90,22	93,65	100,0				
Cgc11	68.24	72.14	73.24	79.74	88,12	88,47	87,46	86,43	88,21	92,17	100,0			
Cgc12	64.15	76.30	71.15	82.18	88,35	82,07	82,43	83,92	85,33	83,06	84,38	100,0		
Cgc14	70.83	75.00	75.36	77.85	89,74	90,09	90,91	91,26	88,54	90,74	88,27	79,18	100,0	
Cgc15	70.17	77.32	77.65	81.35	91,26	92,26	93,67	92,16	91,87	91,59	88,47	84,14	93,29	100,0
Cgc16	66.43	78.65	76.01	82.59	86,64	86,36	92,36	89,47	88,05	88,40	85,89	84,03	87,46	92,21
Cgc17	65.67	80.16	73.44	87.77	83,56	83,28	84,95	85,12	88,49	86,10	83,55	87,18	83,11	87,37
Cgc17.1	67.16	77.65	77.22	81.14	86,10	85,13	88,08	89,73	88,88	89,25	85,99	88,40	85,62	89,19
Cgc18	66.89	72.73	73.79	76.92	85,28	85,01	88,29	87,92	87,83	90,53	87,57	81,43	90,30	88,68
Cgc19	64.93	69.18	70.94	79.24	83,73	84,08	86,13	85,71	89,21	90,70	85,46	79,23	85,12	87,69
Cgc20	53.67	63.30	60.46	70.59	70,03	71,00	70,35	70,06	74,14	70,49	69,34	67,30	69,79	72,78
Cgc23	67.37	79.55	78.39	84.07	88,67	89,03	87,94	89,54	91,25	87,85	87,85	84,14	88,82	90,97
Cgc25	69.89	77.65	76.53	83.61	91,37	91,72	90,00	91,61	91,36	90,46	89,23	82,99	92,11	92,99
Cgc26	73.93	73.17	74.91	79.23	89,30	89,02	88,62	87,04	89,94	89,08	87,31	81,17	85,80	84,41

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

	CR5	3564	3739	6236	6727	6739	10166	11086	11325	11327	34R	Cg1	Cg2	Cg3
CR5	100,0													
3564	97,21	100,0												
3739	94,94	96,44	100,0											
6236	94,94	95,79	96,03	100,0										
6727	96,59	96,83	97,09	97,09	100,0									
6739	92,31	92,46	95,30	95,30	95,08	100,0								
10166	95,30	96,15	93,77	96,39	95,51	95,68	100,0							
11086	96,63	98,13	95,85	96,48	97,50	93,20	96,83	100,0						
11325	92,95	93,11	91,95	95,97	94,42	95,24	96,34	93,85	100,0					
11327	93,67	94,50	91,39	95,36	93,85	95,30	97,05	94,57	96,64	100,0				
34R	94,33	94,51	92,21	93,46	93,90	90,85	93,83	95,18	90,85	92,83	100,0			
Cg1	74,70	75,08	75,47	72,33	74,46	72,61	72,27	74,77	70,06	71,70	78,34	100,0		
Cg2	76,25	76,68	78,43	75,16	76,68	75,50	73,79	75,71	74,17	72,55	78,77	90,68	100,0	
Cg3	72,50	72,84	74,51	71,89	72,84	72,85	70,55	71,92	70,20	69,93	75,08	88,20	92,90	100,0
Cg4.3	15,67	14,56	14,96	14,17	15,32	14,40	13,23	14,34	14,40	14,17	15,38	14,07	15,50	10,85
Cg9	70,48	69,54	70,44	69,18	70,77	70,70	69,26	69,30	68,79	69,18	72,40	85,63	86,33	85,09
Cg11	73,43	73,17	75,39	71,65	73,78	70,66	69,75	73,49	68,14	67,91	75,29	88,43	89,23	86,77
Cg17	76,07	75,86	76,92	73,08	75,86	73,38	73,01	74,92	71,43	71,15	77,94	90,24	92,14	89,24
Cg17.1	74,38	72,84	73,20	73,20	74,12	74,84	72,49	71,92	75,50	73,20	75,69	83,23	87,74	84,52
Cg18	71,22	70,91	71,83	69,35	70,91	71,47	69,32	70,06	70,22	69,35	73,68	84,95	87,46	83,79
Cg20	74,46	74,84	77,17	73,31	74,84	72,96	71,97	73,91	71,10	70,74	76,97	89,30	92,06	88,88
Cg20.1	71,18	71,47	71,78	68,10	70,27	67,70	68,08	70,62	65,84	66,87	73,62	87,72	85,45	84,24
Cg27	75,60	75,40	75,78	72,05	74,77	71,70	72,00	74,47	69,81	70,19	77,42	90,53	90,18	88,34

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

	Cgc1	Cgc2	Cgc2.7	Cgc3	Cgc4	Cgc5	Cgc6	Cgc8	Cgc9	Cgc10.1	Cgc11	Cgc12	Cgc14	Cgc15
CR5	79,32	58.78	60.78	66.88	72.73	71.87	77.91	75.32	76.97	77.34	76.13	71.33	73.40	75.62
3564	81.94	60.29	60.87	65.77	73.08	72.20	77.74	74.43	76.16	76.54	75.30	70.98	74.68	76.03
3739	80.43	61.89	61.71	65.98	74.10	73.20	80.77	74.83	76.58	76.97	75.07	72.02	75.72	77.12
6236	79.71	61.89	59.49	65.29	70.82	70.59	77.56	72.85	74.05	73.19	71.29	71.32	71.84	74.50
6727	78.86	60.29	59.42	65.72	72.43	72.24	78.37	73.79	75.54	75.92	74.29	71.67	74.05	76.03
6739	77.98	62.83	61.13	68.29	70.43	70.20	76.62	71.81	75.64	73.48	74.69	73.75	71.47	74.83
10166	79.58	60.43	60.29	65.31	70.13	69.90	75.55	71.47	73.98	73.12	71.56	70.58	71.15	74.43
11086	81.51	60.14	59.28	64.24	72.15	70.92	77.40	73.48	75.23	75.61	71.25	70.03	74.37	75.70
11325	77.98	62.83	60.38	66.90	68.44	68.21	74.02	70.47	73.72	70.93	75.00	73.05	69.50	72.84
11327	80.43	61.87	60.97	66.67	68.85	68.63	73.08	71.52	74.05	72.55	69.64	72.02	69.90	73.20
34R	79.33	63.38	63.19	69.03	75.31	75.08	79.76	75.39	78.80	78.57	71.29	73.44	75.60	78.15
Cg1	70.71	72.60	74.38	82.08	91.59	91.92	88.41	89.94	90.36	90.09	76.19	80.13	90.46	90.68
Cg2	68.77	75.08	74.72	81.35	86.03	86.45	91.77	87.58	91.25	91.59	87.68	85.51	90.09	91.61
Cg3	65.96	71.37	72.53	78.64	85.44	84.81	89.24	86.27	90.62	89.72	88.47	80.68	85.62	89.03
Cg4.3	14.59	16.59	17.19	14.81	15.56	15.50	15.15	16.53	14.93	17.10	85.35	16.80	16.85	15.50
Cg9	64.65	73.31	70.88	82.08	82.87	83.23	85.36	86.79	86.14	85.28	17.84	80.79	83.69	86.33
Cg11	68.67	73.94	73.61	78.71	89.51	89.85	89.43	85.98	89.55	90.48	84.08	79.34	89.02	88.00
Cg17	69.42	77.09	78.14	82.39	90.79	91.14	90.68	89.74	91.41	90.52	89.88	85.13	88.40	92.40
Cg17.1	66.67	78.07	71.06	84.07	80.91	80.64	84.81	82.35	86.87	82.87	90.51	84.14	81.15	85.16
Cg18	65.56	75.52	72.41	79.49	81.59	81.96	84.68	82.35	87.24	84.61	82.24	81.43	84.84	85.01
Cg20	69.65	76.64	77.70	78.67	88.53	88.89	91.59	90.67	89.23	80.80	83.43	89.39	93.08	92.70
Cg20.1	66.23	71.28	77.81	75.55	88.14	88.48	84.52	84.05	87.65	86.80	88.96	77.41	85.28	85.45
Cg27	69.10	76.49	74.74	80.38	88.61	88.96	91.57	90.07	90.48	90.21	87.39	79.74	90.58	90.80

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

	Cgc1	Cgc2	Cgc2.7	Cgc3	Cgc4	Cgc5	Cgc6	Cgc8	Cgc9	Cgc10.1	Cgc11	Cgc12	Cgc14	Cgc15	
Cg28	62.22	74.01	72.09	73.57	77.55	77.29	76.41	76.29	76.72	73.86	79.08	78.54	73.82	75.93	
Cg29	70.20	74.82	75.86	80.77	92.02	92.35	91.29	87.92	90.80	90.53	91.71	82.08	88.48	91.13	
P13	75.00	56.08	75.86	58.38	66.67	65.87	71.72	67.87	69.16	68.96	70.11	63.72	69.41	70.02	
	CR5	3564	3739	6236	6727	6739	10166	11086	11325	11327	34R	Cg1	Cg2	Cg3	
Cg28	62.95	61.74	63.23	61.85	61.74	61.32	59.18	60.92	61.32	61.17	65.16	74.92	76.61	72.54	
Cg29	76.56	76.36	76.78	73.07	75.76	72.72	73.01	75.45	70.85	71.21	78.36	92.03	91.13	89.30	
P13	86.45	87.06	86.49	86.49	87.65	83.89	85.71	88.37	84.50	84.68	84.66	68.77	70.03	66.47	
	Cg4.3	Cg9	Cg11	Cg17	Cg17.6	Cg18	Cg20	Cg20.1	Cg27	Cg28	Cg29	P13			
Cg4.3	100.0														
Cg9	25.18	100.0													
Cg11	17.58	84.87	100.0												
Cg17	17.42	87.80	90.63	100.0											
Cg17.1	19.38	85.71	81.85	85.44	100.0										
Cg18	25.45	91.44	84.79	87.69	86.85	100.0									
Cg20	19.01	85.63	90.30	91.59	83.81	87.95	100.0								
Cg20.1	19.42	81.87	86.38	89.28	78.18	84.15	88036	100.0							
Cg27	18.98	87.57	90.91	92.77	84.05	89.90	93.05	90.17	100.0						
Cg28	26.34	80.78	76.13	81.06	77.97	82.05	77.33	78.09	77.81	100.0					
Cg29	17.45	86.72	91.81	95.49	84.40	87.21	90.36	90.49	94.46	80.13	100.0				
P13	21.75	68.19	69.32	69.39	68.25	69.49	70.17	67.79	71.39	63.35	71.18	100.0			

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

145

	Cgc16	Cgc17	Cgc17.1	Cgc18	Cgc19	Cgc20	Cgc23	Cgc25	Cgc26
CR5	74.84	71.94	73.85	73.59	73.46	58.62	71.87	74.07	81.65
3564	73.95	70.27	72.24	72.72	72.02	57.47	71.56	74.44	80.96
3739	95.65	72.66	73.97	74.30	72.34	56.88	71.89	74.83	80.24
6236	73.02	72.66	72.60	70.58	69.30	56.88	70.58	72.25	78.39
6727	75.24	72.29	72.90	73.93	72.02	57.47	70.92	73.18	80.36
6739	74.66	75.08	73.61	72.10	70.15	59.39	72.84	72.54	76.87
10166	73.61	71.23	72.54	69.93	69.27	58.16	71.84	72.84	78.28
11086	74.28	70.00	71.94	71.85	71.17	56.81	70.66	73.52	80.00
11325	72.00	72.98	73.61	69.59	67.69	58.18	71.52	70.58	75.62
11327	71.05	72.66	72.60	69.69	68.69	58.68	72.54	71.61	76.54
34R	76.78	74.67	74.59	74.85	74.71	60.05	73.84	75.98	83.38
Cg1	85.00	83.93	84.41	86.13	85.79	69.71	90.06	92.63	88.23
Cg2	88.31	86.00	88.51	88.68	87.68	69.82	88.38	89.80	87.80
Cg3	85.71	82.59	84.13	86.23	87.08	69.23	86.45	87.89	86.58
Cg4.3	17.96	15.76	17.21	26.18	24.19	44.75	17.05	16.03	16.66
Cg9	85.62	83.27	85.06	83.68	83.47	76.00	88.19	86.50	82.94
Cg11	85.44	84.41	84.24	86.50	85.05	69.69	86.45	88.14	88.62
Cg17	91.07	86.95	87.41	87.08	87.90	72.67	91.13	92.50	92.81
Cg17.1	86.36	87.37	86.49	81.96	81.08	73.96	86.45	84.71	84.75
Cg18	86.15	84.51	84.98	84.30	81.71	77.18	88.68	87.61	82.63
Cg20	90.73	85.91	88.37	91.57	86.39	74.14	91.42	93.42	88.28
Cg20.1	82.92	79.87	81.64	83.57	83.28	71.50	87.87	89.22	87.93
Cg27	90.12	83.49	84.61	88.63	87.11	73.45	91.41	92.73	90.69

“...Continua...”

"TABELA 1A, Cont."

	Cgc16	Cgc17	Cgc17.1	Cgc18	Cgc19	Cgc20	Cgc23	Cgc25	Cgc26
Cgc16	100.0								
Cgc17	89.35	100.0							
Cgc17.1	91.16	88.89	100.0						
Cgc18	88.00	84.52	86.90	100.0					
Cgc19	85.20	82.28	82.76	84.57	100.0				
Cgc20	72.62	71.65	70.99	73.80	79.22	100.0			
Cgc23	89.61	88.74	90.54	88.68	84.68	75.74	100.0		
Cgc25	90.38	87.54	89.33	88.82	87.24	73.68	96.18	100.0	
Cgc26	87.12	83.60	84.08	85.22	86.61	70.22	87.20	89.16	100.0
Cgc28	75.08	77.69	76.86	73.71	72.32	69.34	80.00	78.26	77.31
Cgc29	88.00	83.87	84.34	86.05	87.43	73.80	89.30	91.84	92.75
P13	68.05	64.37	65.01	67.23	65.55	56.98	65.87	66.86	73.80

