

NELSON DIAS SUASSUNA

**Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*,
controle químico e resistência em algodoeiro**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título de
“*Doctor Scientiae*”

BRASIL
VIÇOSA - MINAS GERAIS
2005

NELSON DIAS SUASSUNA

**Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*,
controle químico e resistência em algodoeiro**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título de
“*Doctor Scientiae*”

APROVADA, 31 de março de 2005.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Conselheiro)

Dr. Carlos Roberto Casela

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À família: Laís, Lucas e Taís e ao Sr. Peño.

À Universidade Federal de Viçosa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

BIOGRAFIA

Nelson Dias Suassuna, filho de Nelson Francisco Suassuna e Maria de Lourdes Dias Suassuna, nasceu em Brasília, no Distrito Federal, no dia 14 de agosto de 1975.

Concluiu o 2º grau na Escola Agrotécnica Federal de Vitória de Santo Antão, em Pernambuco, no ano de 1992.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, em 1998.

Concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa em março de 2001.

Em abril de 2001 iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa. Desde maio de 2002 é pesquisador da Embrapa Algodão.

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Seleção em Algodoeiro para Resistência à Ramulose Causada por <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	14
1.1 Resumo.....	14
1.2. Introdução.....	16
1.3. Material e Métodos.....	17
1.3.1. Seleção para resistência.....	17
1.3.2. Série diferenciadora.....	20
1.4. Resultados.....	21
1.5. Discussão.....	24
1.6. Referências bibliográficas.....	36
2. Estrutura Genética de Populações de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	39
2.1 Resumo.....	39
2.2. Introdução.....	41
2.3. Material e Métodos.....	43
2.3.1. Compatibilidade sexual.....	44
2.3.2. Compatibilidade vegetativa.....	44
2.3.3. Estudo de subpopulações com marcador AFLP.....	46
2.4. Resultados.....	48
2.5. Discussão.....	50
2.5. Referências bibliográficas.....	59
3. Sensitivity of <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> to Carbendazim, Tebuconazole, and Azoxystrobin Under Laboratory Conditions and Chemical Control of Cotton Ramulose Under Field Conditions.....	63
3.1 Abstract.....	63
3.2. Introduction.....	64
3.3. Material and Methods.....	65
3.3.1. Fungicide resistance assays.....	65
3.3.2. Effect of systemic fungicides on ramulose progress under field conditions.....	67
3.4. Results.....	68
3.5. Discussion.....	70
3.5. Literature cited.....	79
CONCLUSÃO GERAL	81

RESUMO

SUASSUNA, Nelson Dias, D. S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2005.
Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodoeiro. Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Conselheiros: Luiz Antonio Maffia e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A ramulose é uma das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro, maior região produtora. Conduziram-se dois ensaios em campo visando selecionar plantas com resistência à ramulose em linhagens e em acessos sem características comerciais. As mesmas linhagens também foram avaliadas para resistência à mancha de ramulária, mancha angular, mosaico das nervuras e ao complexo Fusarium e nematóide. Foi possível distinguir entre resistência e suscetibilidade à ramulose em ambos os ensaios de campo ($P < 0,0001$ e $P = 0,002$, ensaio de linhagens e acessos do banco de germoplasma, respectivamente). Para avaliar possível série diferenciadora de raças de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), seis isolados do patógeno foram inoculados em 30 acessos de algodoeiro. Destes acessos, dois desenvolveram ou não sintomas dependendo do isolado usado. Esses acessos, em conjunto a outros dois resistentes e dois suscetíveis aos isolados empregados, foram selecionados para compor uma série diferenciadora para distinguir raças de Cgc. Com base em 133 isolados estudou-se a estrutura genética de populações de Cgc em três regiões com diferentes idades de cultivo. Foram analisados 23 locos AFLP e detectou-se baixa diversidade genética total ($H_t = 0,139$) e baixa diversidade genética dentro de subpopulações ($H_s = 0,133$). O número médio de migrantes foi estimado em 11,9 indivíduos a cada geração entre as três subpopulações. Não foi observada formação de estrutura sexuada (peritécio) *in vitro* após pareamento de 17 isolados em todas as combinações possíveis. Apenas um grupo de compatibilidade vegetativa foi identificado com base em testes de complementação usando 76 mutantes auxotróficos na rota de metabolismo do nitrato. Inferiu-se que a população brasileira de Cgc tem estrutura clonal, com ausência de grupos de compatibilidade vegetativa e sem aparente reprodução sexuada. Ocorre grande fluxo gênico e sementes infectadas desempenham importante papel nessa dispersão, principalmente para áreas novas. Isolados de Cgc foram também caracterizados quanto à sensibilidade aos fungicidas carbendazim, tebuconazole e azoxystrobin. Não houve evidências de resistência de Cgc aos fungicidas avaliados. Os

valores de ED₅₀ para os fungicidas carbendazim, tebuconazole e azoxystrobin variaram, respectivamente, de 0,037 a 1,474, de 0,020 a 0,191 e de 0,019 a 0,068 µg i.a./mL. O controle químico em condições de campo reduziu o progresso da doença, todavia não evitou perdas significativas em produtividade.

ABSTRACT

SUASSUNA, Nelson Dias, D. S. Universidade Federal de Viçosa, March 2005.
Characterization of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* populations, chemical control, and cotton resistance. Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.
Committee Members: Luiz Antonio Maffia and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

“Ramulose” or “Witches’ broom” is caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc) and is one of the main cotton diseases in the savannah region of Brazil, the major producing area. Two field assays were conducted with breeding lines and active germplasm bank (AGB) accessions to select cotton resistant genotypes. The breeding lines were also evaluated to ramularia leaf spot, bacterial blight, mosaic vein virus, and nematode - fusarium complex resistance at field conditions. Resistant and susceptible genotypes were differentiated in both assays ($P < 0.0001$ and $P = 0.002$ for breeding lines and AGB accessions assays, respectively). In order to establish a set of cotton differential series to detect Cgc pathotypes, six Cgc isolates were inoculated in 30 cotton genotypes. Reaction of two cotton accessions varied according to Cgc isolate. These two in addition to two resistant and two susceptible accessions were selected to form a cotton differential set to determine Cgc pathotypes. Pathogen population structure was investigated by analyzing 133 isolates collected from three major cotton producing areas. A total of 23 AFLP loci were analyzed. The total and within subpopulation genetic diversity were low, $H_t = 0.139$ and 0.133 , respectively. The estimated average number of migrants among the subpopulations, per generation, was 11.9. No sexual structure (perithecium) was formed in crosses established *in vitro* for 17 isolates in all possible combinations. A single vegetative compatibility group (VCG) was identified based on complementation tests using 76 auxotrophic mutants in nitrate metabolic pathway. One mutant did not form heterokarion and was self-incompatible. Genotypic diversity varied among subpopulations and one haplotype was found in high frequency in all subpopulations. There was no correlation between genetic and geographic distances. There is strong evidence that the population of Cgc has a clonal structure, with no VCG, and sexual reproduction does not seem to play an important role. Gene flow among subpopulations was high and infected seeds are important to pathogen introduction/dispersal into new areas. Sensitivity of Cgc isolates to carbendazim,

tebuconazole, and azoxystrobin was assessed. Baseline population sensitivity was established with isolates collected where no fungicide was used. For *in vitro* assays, the ED₅₀ values of carbendazim (n=88 isolates) ranged from 0.037 to 1.474 µg a.i./mL, a 40-fold sensitivity factor. No resistance to carbendazim (ED₅₀ > 10 µg a.i./mL) was detected. Similarly, ED₅₀ values for tebuconazole (n=91) and azoxystrobin (n=82) were low and ranged from 0.020 to 0.191 and from 0.019 to 0.068 µg a.i./mL, respectively. In a field assay, disease progress was followed on the susceptible cultivar BRS Ipê. Plots artificially inoculated were treated twice with fungicides in several combinations. Fungicides were not effective in controlling ramulose, although differences (P=0.007) regarding area under the disease progress curve among treatments were detected. Lack of disease control was attributed to heavy rain during the season as well as a delay in the first fungicide application

INTRODUÇÃO GERAL

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das culturas anuais mais importantes do Brasil, pelo seu valor econômico e social. A importância social é dada pelos altos contingentes de mão-de-obra e por ser fonte de renda importante nas pequenas propriedades. Já a cotonicultura no cerrado, principalmente nos Estados do Mato Grosso, Goiás e Bahia, representa um segmento de geração de divisas com alta importância econômica e se caracteriza pelo cultivo em grandes propriedades com a utilização maciça de tecnologia. O recente aumento nas áreas plantadas no cerrado, todavia, gerou novos problemas, principalmente fitossanitários.

Apesar de relevo, solo e precipitações favoráveis ao plantio de algodão no cerrado, as condições climáticas também favorecem a ocorrência de doenças fúngicas. Atualmente, uma das doenças mais importante no cerrado brasileiro, e particularmente no Estado de Mato Grosso, é a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* A. S. Costa. A ramulose é mais severa quando ocorre em plantas jovens, até 60 dias (Abrahão, 1961). Além do algodoeiro cultivado, a ramulose também afeta outras espécies do gênero *Gossypium* (Costa & Fraga Jr., 1939).

1. A ramulose do algodoeiro

A ramulose do algodoeiro foi constatada pela primeira vez no Estado de São Paulo no município de Rancharia em 1936 (Costa & Fraga Jr., 1937). Pensou-se, no início, tratar-se de uma doença causada por vírus. Em 1939, os mesmos autores denominaram o agente causal desta doença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e foi confirmado que somente este patógeno, e não *C. gossypii*, causava a ramulose em algodoeiro (Costa & Fraga Jr., 1939). Atualmente, a ramulose encontra-se distribuída em quase todos os Estados do Brasil onde se cultiva o algodão.

Além de São Paulo e Paraná, a ramulose foi detectada também nos Estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará, Bahia, Goiás (Cia, 1977), Ceará (Araújo *et al.*, 1978), Mato Grosso do Sul (Cia & Salgado, 1997) e em Minas Gerais (Gaeiras, 1978). Fora do Brasil, sua ocorrência é relatada somente na Venezuela (Malaguti, 1955) e Paraguai (Mathieson & Mangano, 1985).

Os sintomas se caracterizam inicialmente pelo aparecimento de lesões necróticas em plantas de qualquer idade, preferencialmente em tecidos jovens da haste principal e/ou secundária, na forma de lesões necróticas nos bordos, limbo foliar e nervuras. As lesões nas folhas são arredondadas, mas quando ocorrem nas nervuras são alongadas. O tecido necrosado se rompe originando perfurações nas folhas e o crescimento desigual do tecido provoca enrugamento do limbo foliar. Logo após o surgimento das primeiras lesões em folhas, ocorre a morte do meristema apical do ramo atacado, paralisando assim o crescimento do ramo e estimulando a brotação de gemas laterais, o que confere à planta um aspecto envassourado, com ramos apresentando entrenós curtos e contorcidos, o que reduz o porte da planta (Costa & Fraga Jr., 1937). Na Venezuela e em alguns países de língua inglesa, a doença é conhecida por “*witches’ broom*”, devido à semelhança dos sintomas com aqueles característicos da vassoura-de-bruxa do cacaueiro e pela aparência de vassoura, induzida às plantas infectadas pela emissão de ramificações excessivas (Malaguti, 1955, Watkins, 1981).

Plantas infectadas antes do florescimento abortam estruturas florais devido à competição por seiva pelos demais ramos vegetativos. A ramulose tardia (de ocorrência a partir da fase de florescimento) pode provocar superbrotamento, porém com pouca ou nenhuma redução na produtividade (Juliatti & Ruano, 1997). A inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas com 25 e 35 dias após a emergência provoca maior severidade que em plantas mais velhas, entretanto a percentagem de infecção nas sementes e a transmissão da doença da semente para a plântula é baixa. O período fenológico mais favorável para a infecção das sementes e transmissão do patógeno semente-plântula é quando a maçã já está desenvolvida (Santos *et al.*, 1993). O maior aumento da incidência da ramulose em condições de campo foi verificado aos 81 dias após a emergência, quando a umidade relativa e as temperaturas mínimas atingiram valores máximos de 90% e 18°C, respectivamente. A paralisação da doença coincidiu com a escassez das chuvas e a redução da temperatura para 12,8°C, demonstrando que tais variáveis climáticas são importantes no desenvolvimento da ramulose. Foi verificado ainda que a doença atingiu uma distância de 9 metros da fonte de inóculo

após 46 dias de emergência e é mais severa em condições de umidade e temperatura altas e dias nublados (Santos *et al.*, 1994).

A principal via de transmissão do patógeno é pela semente, responsável pela introdução da doença em áreas indenens. O fungo tanto pode ser transportado na superfície externa das sementes como no interior da amêndoa, numa percentagem que varia de 5 a 9% dependendo da resistência do genótipo (Lima *et al.*, 1985, Pizzinatto *et al.*, 1994). O patógeno pode sobreviver por até 12 meses na semente armazenada com umidade em torno de 12 a 13% e temperatura variando de 16,6 a 33°C (Lima *et al.*, 1985). A percentagem de sementes infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* está relacionada ao estágio de desenvolvimento do algodoeiro e com as condições de precipitação pluviométrica e de umidade relativa do ar prevalentes durante a formação e desenvolvimento das maçãs (Lima *et al.*, 1985, Santos *et al.*, 1993).

Aparentemente, não há relação entre o índice de severidade de doença no campo e transporte de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela semente (Nascimento Jr. *et al.*, 1997). É possível que genótipos suscetíveis, com índice relativamente elevado de doença no campo, possam produzir sementes cujo nível de incidência do patógeno não seja proporcional à severidade de sintomas na planta. Da mesma forma, sementes de genótipos resistentes podem transportar o patógeno em taxas que não se correlacionam com o grau de resistência da planta (Tanaka & Menten, 1992, Pizzinatto *et al.*, 1994).

Os dados na literatura relativos às perdas ocasionadas pela ramulose são poucos e inconsistentes. Alguns autores relatam prejuízos severos ocasionados pela ramulose, da ordem de 20 a 30%, chegando a 85% em casos extremos (Abrahão, 1949, Abrahão, 1961, Carvalho *et al.*, 1984). Se houver distribuição generalizada da doença no campo as perdas podem ser totais (Costa & Fraga Jr., 1937).

2. Etiologia

O agente causal da ramulose é considerado um patógeno distinto de *C. gossypii*, agente causal da antracnose, apesar de serem morfollogicamente semelhantes. Além da ramulose, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pode causar tombamento em plântulas de algodão. Já a espécie *C. gossypii*, agente causal da antracnose do algodoeiro, afeta somente plântulas, nas quais causa tombamento, e as maçãs.

Os conídios de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são formados em conidióforos curtos nos acérvulos, onde permanecem aderidos devido a uma matriz gelatinosa que os une, sendo a dispersão dos mesmos, nessa situação, realizada por ação de respingos de chuva. Os conídios também são produzidos em extremidades das setas, o que pode facilitar a dispersão do patógeno pelo vento. Como consequência, estes conídios podem atingir plantas mais distantes do que os conídios transportados pela água (Tanaka *et al.*, 1996). A patogenicidade de isolados pode estar relacionada com sua capacidade de esporulação em meio de cultura (Tanaka & Menten, 1992, Lima, 1981).

Tanto *C. gossypii* var. *cephalosporioides* quanto *C. gossypii* são semelhantes a *C. gloeosporioides* e considerados como sendo da mesma espécie (Sutton, 1992). Análise da sequência de nucleotídeos do DNA ribossomal (rDNA) de várias espécies de *Colletotrichum* que infectam plantas da família *Malvaceae* revelou que isolados obtidos de algodão (*C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*) são muito similares entre si e entre diversas formas de *C. gloeosporioides*. Assim, não é apropriado considerar *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* como espécies distintas de *C. gloeosporioides* (Bailey *et al.*, 1996). É possível, portanto, considerar *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, como *formae speciales* de *C. gloeosporioides*. Os autores propuseram a nomenclatura *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypium*. Essa proposta parece inadequada, pois não permite distinguir entre o agente causal da ramulose e o da antracnose do algodoeiro. Considerar-se-á o agente causal da ramulose como *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, a forma imperfeita de *Glomerella gossypii* (Hillocks, 1992), o agente causal da antracnose.

As semelhanças morfológicas entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e dos sintomas induzidos por estes patógenos têm dificultado a diagnose das doenças e identificação dos patógenos. As dificuldades de diagnose são maiores principalmente ao examinar sementes ou plântulas de algodão (Tanaka *et al.*,

1996). No entanto, o hábito de crescimento sobre as sementes de algodão é distinto para as duas espécies, o que ajuda na identificação dos patógenos (Tanaka *et al.*, 1996). Os dois patógenos diferem quanto ao requerimento de asparagina ou ácido aspártico. Estes aminoácidos são requeridos por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, enquanto que *C. gossypii* é auxoautotrófico (Dudienas & Kimati, 1993). Os dois patógenos possuem padrões eletroforéticos distintos para as enzimas esterase, fosfatase ácida e peroxidase (Carvalho *et al.*, 1995), e recentemente, estudos envolvendo marcadores moleculares do tipo RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), permitiram distinguir as duas espécies e ainda revelou variabilidade entre alguns isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Silva-Mann *et al.*, 2002).

3. Controle

O uso de sementes sadias ou tratadas é importante na redução do inóculo inicial da ramulose (Lima *et al.*, 1985). Quando a utilização de sementes livres do patógeno não impede a ocorrência da doença, o que pode ocorrer em áreas onde há intenso monocultivo de algodoeiro, o controle químico é a principal medida de controle utilizada.

Fungicidas do grupo dos triazóis, benzimidazóis ou estrobilurinas são rotineiramente usados no controle da ramulose (Iamamoto, 1999) e nem sempre a eficiência é satisfatória, devido a uma série de fatores, principalmente ocorrência de chuvas após as aplicações ou aplicações após a morte do meristema apical. O uso continuado de um mesmo fungicida pode também selecionar isolados resistentes, entretanto, nenhuma informação existe sobre a sensibilidade de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* aos principais fungicidas utilizados no controle da ramulose.

A medida mais econômica e eficaz de controle da doença é o uso de cultivares resistentes (Lima *et al.*, 1984). Entretanto, cultivares consideradas moderadamente resistentes, como a CNPA ITA 90, podem ser afetadas por epidemias de ramulose. Esse fato levanta a possibilidade de mudanças na população do patógeno, com aumento da frequência de indivíduos capazes de suplantar a resistência das cultivares. Assim, para que um programa de melhoramento genético do algodoeiro visando resistência à ramulose seja eficiente, é necessário se conhecer o germoplasma do hospedeiro, bem como a população do patógeno quanto à sua variabilidade.

4. Resistência em algodoeiro à ramulose

Os primeiros trabalhos realizados no Brasil com o objetivo de avaliar cultivares e linhagens resistentes à ramulose foram realizados na década de 1940. Na época, a maioria das cultivares de algodoeiro herbáceo foi suscetível (Costa, 1941). Mais de 80% das plantas inoculadas, nas gerações F₂ - F₄ da linhagem HR 21 T 16, foram resistentes ou imunes a *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sendo essa linhagem eleita pelo Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPQ) como fonte de resistência para trabalhos de melhoramento do algodoeiro no Brasil (Lima *et al.*, 1984).

A herança da resistência à ramulose do algodão é controlada por um par de genes recessivos e o caráter é possivelmente regulado por ação de outros genes modificadores (Carvalho *et al.*, 1988). Constatou-se que a influência do ambiente na variação fenotípica é reduzida (Carvalho *et al.*, 1994) e que a pilosidade da folha tem correlação positiva com a severidade da ramulose (Carvalho *et al.*, 1985).

Algumas cultivares e linhagens de algodão têm reações diferentes a determinados isolamentos monoconidiais de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, o que sugere a existência de raças fisiológicas do patógeno (Lima & Chaves, 1982, Tanaka & Menten, 1992). Além desta observação, a impossibilidade de ordenamento de cinco de seis isolados estudados em relação ao genótipo, e destes em relação aos isolados, também evidencia a existência de raças de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e resistência vertical incompleta (Tanaka & Menten, 1992). Não existe, até o momento, uma série de plantas de algodão que permita diferenciar raças de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A obtenção de dados que demonstrem a existência de raças fisiológicas do patógeno constitui informação que deve ser considerada nos programas de melhoramento visando a obtenção de resistência à ramulose.

4.1. Variabilidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

O procedimento usual para estudar a variabilidade fisiológica de um patógeno, tem sido o de utilizar padrões comparativos por meio de inoculação artificial em plantas, sob condições controladas. Variação genética tem sido detectada em quase todos os patógenos de plantas que já foram estudados, em características que afetam ou não a sua habilidade de infectar plantas hospedeiras (Habgood, 1970).

A alta severidade da ramulose em cultivares de algodão consideradas até então resistentes, é um indicativo de mudanças na população do patógeno. O primeiro trabalho visando quantificar a variabilidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi conduzido em 1981 (Lima, 1981). Compararam-se 10 isolamentos monoconidiais do

patógeno quanto à patogenicidade e os resultados sugerem a existência de diferentes raças (Lima, 1981). Em outro trabalho, avaliou-se a patogenicidade de seis isolados em plantas de nove genótipos de algodoeiro (Tanaka & Menten, 1992). Os genótipos testados apresentaram diferentes níveis de reação quando inoculados com cada um dos isolados, evidenciando a possibilidade de ocorrência de raças virulentas do patógeno (Tanaka & Menten, 1992).

O conhecimento da variação em características que determinam patogenicidade, obtido por meio de levantamentos na população do patógeno, é valioso para o planejamento de medidas efetivas de controle de doenças, como o uso de genes de resistência e variedades da cultura ou a aplicação de fungicidas (Brown, 1998). Nesse contexto, tornam-se importantes estudos sobre a estrutura genética da população de patógenos.

4.2. Estrutura genética das populações de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

“Estrutura genética” refere-se à quantidade e à distribuição de variação genética dentro e entre populações (McDonald, 1997). Entende-se por população um grupo de indivíduos que cruzam entre si e que co-existem no tempo e no espaço. Essa definição não se encaixa para populações de fungos que se reproduzem de maneira assexuada. Não se sabe se *C. gossypii* var. *cephalosporioides* se reproduz sexualmente, por processos parassexuais e/ou se existem grupos de compatibilidade vegetativa na população do patógeno. Por esta razão, para definir populações de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizar-se-á a definição proposta por McDonald (McDonald, 1997): “um conjunto de indivíduos coexistindo no tempo e no espaço (em um mesmo campo) sujeitos às mesmas forças seletivas”.

O monitoramento sistemático das populações do patógeno é necessário para a compreensão da dinâmica dos aspectos genéticos (quantidade e variação espaço-temporal). Para tal, são necessários marcadores que permitam quantificar a variabilidade genética. Muitas técnicas baseadas em sequências de DNA foram desenvolvidas e são, de maneira geral, baseadas em duas estratégias: i) baseadas em hibridação: envolve a clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição seguidas por separação eletroforética dos fragmentos de DNA gerados e detecção por hibridação com sondas marcadas ou ii) baseadas em PCR (“polimerase chain reaction”): envolve a amplificação *in vitro* de sequências de DNA utilizando iniciadores de transcrição (primers) e uma enzima polimerase termoestável. Os fragmentos amplificados são separados por eletroforese, corados e visualizados.

Um dos métodos que vem sendo empregado no estudo da variabilidade de fungos patogênicos é o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”). Recentemente, utilizando as técnicas de RAPD e isoenzimas, encontrou-se divergência genética de 48% entre isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Silva-Mann *et al.*, 2002). Apesar de RAPD ser um marcador útil para a diferenciação de fungos fitopatogênicos, apresenta pouca repetibilidade pelo fato de o anelamento aleatório envolver seqüências de nucleotídeos (“primers”) com poucos pares de bases - pb (geralmente 10 pb). Marcadores que permitam maior repetibilidade são mais interessantes para estudos de variabilidade genética de fitopatógenos, porém, ainda não há marcadores confiáveis disponíveis para um estudo acurado da estrutura da população de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

O marcador AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) é uma técnica utilizada para visualizar diferenças no DNA genômico entre diferentes amostras (Vos *et al.*, 1995). A técnica de AFLP combina as estratégias de hibridação e PCR e é baseada na amplificação seletiva, por PCR, de um subconjunto de fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição. A técnica consiste em fragmentar o DNA genômico com endonucleases de restrição, e em seguida, adaptadores, com seqüências específicas para os terminais gerados pelas enzimas de restrição, são ligados aos fragmentos para gerar o DNA molde para a amplificação. Assim, a seqüência dos adaptadores e o sítio de restrição servem como sítio de ligação de oligonucleotídeos para subsequente amplificação dos fragmentos de restrição por PCR. Em outra etapa, oligonucleotídeos seletivos estendendo dentro da região do fragmento são anelados aos fragmentos, permitindo que apenas um subconjunto dos fragmentos amplificados seja reconhecido. Apenas fragmentos os quais sejam flanqueados pelos nucleotídeos que se anelem aos oligonucleotídeos inicializadores serão amplificados. O subconjunto de fragmentos amplificados são então analisados por eletroforese com gel desnaturante de poliacrilamida para gerar o padrão de bandas. O polimorfismo detectado no DNA é o resultado de alterações na seqüência de nucleotídeos, incluindo mutações pontuais capazes de abolir ou criar novos sítios de restrição ou deleções e inserções que alteram o tamanho do fragmento visualizado.

Marcadores AFLP são úteis para detectar seqüências de DNA polimórficas em fungos e apresenta vantagens quando comparada ao RAPD. Muitos locos são avaliados por vez em cada reação e primers de maior extensão são utilizados, o que torna a técnica mais reprodutível, além de gerar um maior número de bandas. A desvantagem do AFLP é que requer maior habilidade técnica do que RAPD (ligações, digestão com enzimas de

restrição e géis de poliacrilamida) (McDonald, 1997). Muitos estudos sobre população de patógenos já foram realizados utilizando-se marcadores do tipo AFLP (Baayen *et al.*, 2000, Pongam *et al.*, 1999, Tooley *et al.*, 2002, Vandemark, 1999). Marcadores AFLP têm sido utilizados para caracterização genética de espécies de *Colletotrichum* patogênicas em alfafa (O'Neill, 1997), bem como para separar *C. gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Silva-Mann *et al.*, 2005).

Estudos sobre a população de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* são, ainda, incipientes e, na maioria dos casos, poucos isolados foram utilizados e sempre coletados sem plano de amostragem que assegure a representatividade da população. O conhecimento da estrutura genética da população do patógeno poderá contribuir para entender melhor a epidemiologia da doença e explicar mudanças na reação de cultivares, viabilizando assim, o uso estratégico da resistência e aumentando a eficiência de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão, J. Instruções para o reconhecimento da "Ramulose" do algodoeiro. O Biológico 15: 59-60. 1949.
- Abrahão, J. Combate a ramulose tardia do algodoeiro. O Biológico 27: 121-123. 1961.
- Araújo, F. E., Cavalcante, R. D. & Cavalcante, M. L. S. Ocorrência de ramulose em algodoeiro herbáceo no Ceará. Fitossanidade 2: 89. 1978.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A. & Waalwijk, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. Phytopathology 90: 891-900. 2000.
- Bailey, J. A., Nash, C., Morgan, L. W., O'Connell, K. & TeBeest, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. Phytopathology 86: 1076-1083. 1996.
- Brown, J. K. M. Surveys of variation in pathogen populations and their application to disease control. In: D. G. Jones (Ed.) The Epidemiology of Plant Diseases. Dordrecht. Kluwer Publishers. 1998. pp. 73-102.
- Carvalho, D., Vieira, M. G. G. C. & Machado, J. C. 1995. Utilização de isoenzimas para detecção e identificação de *Colletotrichum* spp. em sementes de algodão.
- Carvalho, L. P., Cavalcanti, F. B., Lima, E. F. & Santos, E. O. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. Fitopatologia Brasileira 9: 593-598. 1984.
- Carvalho, L. P., Cruz, C. D., Morais, C. F. & Lima, E. F. Hereditariedade da resistência do algodoeiro à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa. Ceres 41: 245-262. 1994.
- Carvalho, L. P., Lima, E. F., Carvalho, J. M. F. C. & Moreira, J. A. M. Herança da resistência à ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*). Fitopatologia Brasileira 13: 10-15. 1988.
- Carvalho, L. P., Lima, E. F., Ramalho, F. S., Lukefahr, M. J. & Carvalho, J. M. F. C. Influência da pilosidade do algodoeiro na expressão de sintomas de ramulose. Fitopatologia Brasileira 10: 649-654. 1985.
- Cia, E. Ocorrência e reconhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. Summa Phytopathologica 3: 167-193. 1977.
- Cia, E. & Salgado, C. L. Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: H. E. Kimati (Ed.) Manual de Fitopatologia. 1997. pp. 33-48.
- Costa, A. S. 1941. Investigações sobre ramulose. Relatório - Seção de Algodão (1012). Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas - IAC: 42 p.

- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. *Revista de Agricultura* 12: 249-259. 1937.
- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Sobre a natureza da "ramulose" ou "superbrotamento" do algodoeiro. *Jornal de Agronomia* 2: 151-160. 1939.
- Dudienas, C. & Kimati, H. Caracterização auxanográfica de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 19: 152-156. 1993.
- Gaeiras, L. A. Doenças do algodoeiro. *Informe Agropecuário* 41: 44-47. 1978.
- Habgood, R. M. Designation of physiological races of plant pathogens. *Nature* 227 (5264): 1268-& 1970.
- Hillocks, R. J. Fungal diseases of the boll. In: R. J. Hillocks (Ed.) *Cotton diseases*. Wallingford. CAB International. 1992. pp. 239-261.
- Iamamoto, M. M. Controle da ramulose do algodoeiro e sua influência nas características agronômicas e das fibras. Jaboticabal, 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de concentração em produção vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- Juliatti, F. C. & Ruano, O. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) - Controle de doenças. In: F. X. R. Vale and L. Zambolim (Ed.) *Controle de Doenças de Plantas*. Viçosa. UFV. 1997. pp. 555-558.
- Lima, E. F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose (PhD Thesis). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1981.
- Lima, E. F., Carvalho, J. M. F. C. & Carvalho, L. P. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente de algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 10: 99-109. 1985.
- Lima, E. F., Carvalho, L. P., Santos, E. O. & Carvalho, J. M. F. C. Avaliação de germoplasma de algodoeiro para resistência à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 9: 561-565. 1984.
- Lima, E. F. & Chaves, G. M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 17: 61-66. 1982.
- Malaguti, G. La escobilla del algodón en Venezuela. *Agronomia Tropical* 5: 73-86. 1955.
- Mathieson, J. T. & Mangano, V. Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 11: 115-118. 1985.
- McDonald, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453. 1997.

- Nascimento Jr., A., Athayde, M. L. F., Panizzi, R. C., Iamamoto, M. M., Barreto, M. & Guerreiro, L. R. R. 1997. Transporte de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do índice da doença.
- O'Neill, N. R., van Berkum, P., Lin, J. J., Kuo, J., Ude, G. N., Kenworthy, W. & Saunders, J. A. Application of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* Pathogens of Alfalfa. *Phytopathology* 87: 745-750. 1997.
- Pizzinatto, M. A., Cia, E. & Fuzatto, M. G. Relação entre a severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. *Fitopatologia Brasileira* 19: 50-54. 1994.
- Pongam, P., Osborn, T. C. & Williams, P. H. Assessment of genetic variation among *Leptosphaeria maculans* isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease* 83: 149-154. 1999.
- Santos, G. R., Zambolim, L. & Batista, U. G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. *Summa Phytopathologica* 19: 177-180. 1993.
- Santos, G. R., Zambolim, L., Vale, F. X. R. & Vieira, J. M. Progresso e gradiente da ramulose do algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 19: 390-393. 1994.
- Silva-Mann, R., Salgado, K. C. C., Vieira, M. G. G. C. & Machado, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. *Fitopatologia Brasileira* 27: 027-032. 2002.
- Silva-Mann, R., Vieira, M. G. G. C., Machado, J. C., Bernardino Filho, J. R., Salgado, K. C. C. & Stevens, M. R. AFLP Markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 169-172. 2005.
- Sutton, B. C. The genus *Glomerella* and its teleomorph *Colletotrichum*. In: J. A. Bailey and M. J. Jeger (Ed.) *Colletotrichum* - Biology, pathology and control. Wallingford. CAB International. 1992. pp. 1-26.
- Tanaka, M. A. S. & Menten, J. O. M. Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro. *Summa Phytopathologica* 18: 138-177. 1992.
- Tanaka, M. A. S., Pizzinatto, M. A. & Soave, J. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. I. Avaliação em laboratório. *Summa Phytopathologica* 22: 116-122. 1996.
- Tooley, P. W., Goley, E. D., Carras, M. M. & O'Neill, N. R. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from the United States, Mexico, Africa, Australia, India, and Japan. *Plant Disease* 86: 1247-1252. 2002.

- Vandemark, G. J. Detection of Polymorphisms in Fungi Using the AFLP Technique and Agarose Gels. *Focus* 21: 26. 1999.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414. 1995.
- Watkins, G. M. *Compendium of cotton diseases*. ed. St. Paul, MN, U.S.A. American Phytopathological Society. 1981.

Seleção em Algodoeiro para Resistência à Ramulose Causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Nelson D. Suassuna^{1*}, Camilo L. Morello¹, Luiz A. Maffia², Eduardo S. G. Mizubuti²

¹Embrapa Algodão. Rua Osvaldo Cruz 1143 Centenário – CP 174 CEP 58107-720 [Campina Grande](http://Campina_Grande) – PB, e-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br; ²Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa – MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Nelson D. Suassuna

SUASSUNA, N. D., MORELLO, C. L., MAFFIA, L. A. & MIZUBUTI, E. S. G. Seleção em algodoeiro para resistência à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

A ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), é uma das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro, maior região produtora. Atualmente, as variedades de algodão disponíveis no mercado não possuem níveis de resistência satisfatórios à doença. Conduziram-se dois ensaios em campo visando selecionar plantas com resistência à ramulose em linhagens e em acessos sem características comerciais. As mesmas linhagens também foram avaliadas para resistência à mancha de ramulária, mancha angular, mosaico das nervuras e ao complexo Fusarium - nematóide. Foi possível distinguir entre resistência e suscetibilidade à ramulose em ambos os ensaios de campo ($P < 0,0001$ e $P = 0,002$, ensaio de linhagens e acessos do banco de germoplasma, respectivamente). O acesso CNPA 1689 foi altamente resistente à doença, com apenas poucas lesões nas folhas. Algumas linhagens finais, também resistentes a outras doenças e com boas características de fibra, poderão ser lançadas como variedades. Para avaliar possível série diferenciadora de raças de Cgc, seis isolados do patógeno foram inoculados em 30 acessos de algodoeiro. Dos 30 acessos avaliados, dois desenvolveram ou não sintomas dependendo do isolado usado. Esses acessos, em conjunto a outros dois resistentes e dois suscetíveis aos isolados empregados, foram selecionados para compor uma série diferenciadora para distinguir raças de Cgc.

ABSTRACT

Cotton ramulose, caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), is a major disease of this fiber crop in Brazil. Currently, there is no cotton variety with proper resistance levels. Two field trials were carried out in order to assess resistance in breeding lines and cotton germplasm. The breeding lines were also tested for areolate mildew (*Ramularia areola*), bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*), cotton vein mosaic virus, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* complex. Differences among cotton genotypes were found in both trials ($P < 0.0001$ and $P = 0.002$, for breeding lines and germplasm, respectively). Despite its high level of resistance to ramulose, genotype 1689 was not immune to the pathogen. Some breeding lines resistant to ramulose were also resistant to other diseases and had high fiber quality. These lines can be potentially released as cultivars. In order to establish a set of cotton differential series to detect Cgc pathotypes, six Cgc isolates were inoculated in 30 different cotton genotypes. Reaction of two genotypes varied according to Cgc isolate. These two genotypes in addition to two resistant and two susceptible genotypes were selected to form a cotton differential set to determine Cgc races.

INTRODUÇÃO

No início da década de 1990, com o lançamento de variedades adaptadas ao cerrado, e de maior rendimento de fibra, como a CNPA ITA-90, o cultivo de algodão intensificou-se nos estados do Mato Grosso, Goiás e, mais recentemente, Bahia (Costa, 2004). Nos últimos cinco anos, o Brasil, de grande importador, tornou-se o principal produtor e exportador de algodão na América Latina (Kist *et al.*, 2004). Associado ao aumento de área plantada no cerrado, várias doenças aumentaram em importância, e epidemias de algumas delas, como a ramulose, o mosaico das nervuras e a mancha de ramulária são comuns (Araújo, 2000, Araújo & Suassuna, 2003).

Uma das principais doenças do algodoeiro no Brasil é a ramulose causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* – Cgc (Costa & Fraga Jr., 1939), que é restrito à América do Sul (Malaguti, 1955, Mathieson & Mangano, 1985, Lima *et al.*, 1999). Os sintomas incluem lesões necróticas nas folhas, encurtamento dos internódios e desenvolvimento excessivo de ramos e folhas (superbrotamento), resultante da necrose da gema apical (Miranda & Suassuna, 2004). A doença afeta a planta em todos os estádios de desenvolvimento e, quando ocorre no início do período vegetativo, as perdas podem chegar a 80% (Lima *et al.*, 1999). As condições ambientais durante o cultivo no centro oeste do Brasil, clima quente e úmido, são favoráveis ao desenvolvimento de ramulose.

O manejo da ramulose envolve práticas culturais, principalmente a rotação de culturas, tratamento químico de sementes e aplicação de fungicidas. Entretanto, nem sempre a rotação de culturas é implementada, o que acarreta em aumento do inóculo inicial para as próximas safras. O controle químico nesses casos é a única tática empregada para manejo da doença.

O uso de resistência genética é a maneira mais rápida e econômica de controle de doenças do algodoeiro (Lima *et al.*, 1984). Estudos com objetivo de obter variedades resistentes à ramulose iniciaram-se logo após o primeiro relato da doença no Estado de São Paulo. Na época, a maioria dos materiais testados foi suscetível (Costa, 1941). Em ensaios conduzidos na Venezuela, algumas variedades não desenvolveram sintomas da doença (Malaguti, 1955). Mais recentemente, identificou-se a linhagem HR21 T 16 com alta resistência (Lima *et al.*, 1984).

Em cruzamentos realizados entre uma linhagem avançada (F₄) originada de HR21 T 16, imune à ramulose, e o genótipo SU 0450-8909, altamente suscetível, elucidou-se que a resistência é condicionada por um par de genes recessivos com baixo

grau de herdabilidade (Carvalho *et al.*, 1988). A influência do ambiente na variação fenotípica é baixa (Carvalho *et al.*, 1994) e a pilosidade da folha correlaciona-se positivamente com a suscetibilidade à doença (Carvalho *et al.*, 1985), portanto plantas glabras ou com poucos pêlos são mais resistentes.

Existe variação na resistência de algodoeiro à ramulose. Algumas variedades e linhagens possuem reações distintas a determinados isolados monoconidiais de Cgc, o que sugeriu a existência de raças fisiológicas (Lima & Chaves, 1992, Tanaka & Menten, 1992). Todavia, até o momento, não foi estabelecida uma série de plantas de algodoeiro capazes de distinguir raças do patógeno. Uma série de plantas diferenciadoras de raças padroniza estudos acerca da dinâmica de patótipos no tempo e no espaço com base no seu espectro de virulência.

Os objetivos deste trabalho foram identificar fontes de resistência à ramulose em algodoeiro (acessos pertencentes ao banco de germoplasma e linhagens do programa de melhoramento genético) e estabelecer uma série de plantas diferenciadoras para discriminar raças do patógeno. Avaliou-se, também, a reação das linhagens a outras doenças do algodoeiro, bem como o potencial produtivo e característica de fibra das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

O termo “resistência” será usado em sentido amplo: inclui redução de colonização, crescimento ou reprodução do patógeno, bem como mecanismos de pré-penetração. O termo “imunidade” descreve ausência de sintomas, após inoculação com Cgc (Bird, 1973).

Seleção para resistência

Em dois ensaios conduzidos em condições de campo, no município de Santa Helena de Goiás – GO, avaliou-se a resistência de linhagens (avanzadas e finais) ou acessos disponíveis no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Algodão à ramulose. As linhagens avanzadas e finais foram também avaliadas para resistência à mancha de ramulária (*Ramularia areola*), mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*), mosaico das nervuras (Polerovirus, Luteoviridae) e complexo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* (F+N). O ensaio de seleção para resistência ao complexo F+N foi em Acreúna – GO, em área cultivada com algodão por mais de 15 anos e altamente infestada por ambos os patógenos.

Os ensaios com as linhagens foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições e 28 tratamentos, 3 cultivares e 25 linhagens (Tabela 1). Foram incluídos dentre os tratamentos, as variedades BRS-Aroeira (resistência moderada à ramulose, mancha angular, mosaico das nervuras e ao complexo F+N), BRS-Ipê (resistência moderada à mancha de ramulária e suscetível às demais doenças) e Delta Opal (suscetível à ramulose, mancha de ramulária e F+N, porém imune à mancha angular e mosaico das nervuras). Nos ensaios de seleção de linhagens resistentes à ramulose, ramulária e mancha angular, não se empregou fungicida ou bactericida. No ensaio de identificação de fontes de resistência ao mosaico das nervuras não se utilizaram inseticidas até os 63 dias após a emergência das plantas, para permitir alta população do vetor da virose, o afídeo *Aphis gossypii*. No ensaio de resistência ao complexo F+N, fungicidas foram utilizados para controle das doenças da parte aérea.

O ensaio com os acessos do BAG foi conduzido em delineamento experimental de blocos aumentados (Federer, 1961) com dois tratamentos comuns (variedades BRS-Aroeira e Delta Opal) e 140 tratamentos regulares (Tabela 6).

Em todos ensaios, a unidade experimental foi composta por duas linhas de 5 m, espaçadas por 0,9 m entre si e com densidade de oito plantas/m.

Inoculação

Houve inoculação natural de todos os patógenos, à exceção de Cgc. Para inoculação dos ensaios de ramulose, seis isolados de Cgc, amostrados de áreas produtoras no Brasil, foram cultivados em meio de batata-dextrose-água (BDA) em placas de Petri, mantidas em incubadora a 25° C com fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) foram adicionados a cada placa, e conídios foram retirados suavemente com auxílio de pincel. Suspensões calibradas entre 5×10^4 e 1×10^5 conídios/mL foram usadas para inocular algodoeiros aos 36 dias após a emergência (DAE).

Avaliaram-se as doenças de parte aérea (ramulose, mancha de ramulária, mancha angular e mosaico das nervuras) aos 70 DAE em 20 plantas, escolhidas aleatoriamente, nas duas linhas da parcela. A severidade da ramulose foi quantificada com base em escala de notas (Araújo *et al.*, 2003) em que: 1 = sem sintomas; 2 = lesões necróticas nas folhas jovens; 3 = lesões nas folhas, encurtamento dos internódios e início de emissão de brotos laterais (até 3 novos brotos); 4 = lesões nas folhas, encurtamento dos internódios, emissão de brotos laterais (entre 3 e 10 brotos), pouco desenvolvimento vegetativo e 5 = lesões nas folhas, encurtamento dos internódios, emissão de brotos laterais (mais de 10 brotos) e nanismo. A partir das notas foi obtido o

índice de intensidade de infecção (I), expresso como $I = \sin^2 \omega$, para cada distribuição de frequência obtida na parcela (Amaral, 1969). A transformação angular $w = \sum_{j=1}^5 K_j \sqrt{P_{j-1,5}} \arcsen \sqrt{f_j}$ permite a análise de variância (Czermainski, 1999), onde K = valores constantes determinados a partir da atribuição do valor teórico máximo de cada nota da escala, P = probabilidade de infecção, estimada pela frequência relativa correspondente e f_j = frequência relativa de cada nota. A variável ω foi calculada para converter notas em escalas de intervalos. Os dados do ensaio de linhagens foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott (Scott & Knott, 1974). A análise estatística do ensaio BAG foi realizada seguindo um programa desenvolvido para o delineamento de blocos aumentados (Scott & Milliken, 1993), e as médias dos tratamentos foram agrupadas com base no método de ligação por médias das distâncias (Dias, 1998). Os critérios adotados para separação dos grupos formados foram o teste do *Pseudo F*, análise de critério de agrupamento cúbico (“*cubic clustering criterion*” ou CCC) e a opção t^2 . Para tal foi utilizado o procedimento Cluster no software SAS System v. 8.0.

Nas avaliações da mancha de ramulária e mancha angular foi atribuída uma nota a cada parcela (Araújo *et al.*, 2003) correspondente à severidade média. A intensidade do mosaico das nervuras foi quantificada pela incidência de plantas com virose (PPV). Considerando que a redução de altura é sintoma reflexo da suscetibilidade ao complexo F+N, ao final do ciclo, mensurou-se a altura de cinco plantas, escolhidas aleatoriamente, em cada parcela.

Em todos os ensaios, após a abertura dos capulhos, a fibra foi colhida e pesada, determinou-se a produção (sem separar fibra da semente) por parcela, e os dados foram transformados em kg/ha. No ensaio de F+N, em vista do controle rigoroso das doenças de parte aérea, também foram colhidas amostras-padrão de 20 capulhos em cada parcela, e, no laboratório, analisaram-se fibras com processador HVI, (“*High Volume Instrument*”) para determinar o índice Micronaire (finura, $\mu\text{g/pol}$), comprimento (mm) e resistência de fibra (grama força por textile - medição da força requerida para romper uma amostra de fibra). Para esse ensaio, determinou-se também o rendimento de fibra, pela separação da semente. Correlacionaram-se os dados de severidade (mancha de ramulária e angular), ω , PPV, altura média (F+N) e produtividade. Para se determinar quais doenças causam maior impacto na produção de algodão, todos os possíveis pares de coeficientes de correlação de Pearson, em cada combinação severidade x produtividade, foram comparados por meio do teste desenvolvido por Rob van Son

(código em http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Two_Correlations.html). Este procedimento testa a hipótese de não haver diferença entre dois coeficientes de correlação, assumindo que os valores de ambas as amostras possuem distribuição normal. Os dois coeficientes a serem comparados são submetidos à transformação Z de Fisher: $Z_f = \frac{1}{2} \ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right)$. A diferença $Z = (Z_{f_1} - Z_{f_2}) / \sqrt{1/(N_1 - 3) + 1/(N_2 - 3)}$ em que N_1 e N_2 são o número de pontos nas amostras 1 e 2, respectivamente, tem distribuição aproximadamente normal. O valor de Z é usado para determinar o nível de significância.

Série diferenciadora

Para estabelecer uma série diferenciadora de raças de Cgc, foram conduzidos seis ensaios usando 30 acessos (Tabela 4) selecionados com base em reação conhecida de resistência ou suscetibilidade à ramulose, origem geográfica ou nível de pilosidade. Cada acesso foi previamente autofecundado por duas gerações, para produzir a quantidade de sementes necessária e eliminar possíveis plantas heterozigotas. Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado com duas repetições. Em vasos de 10 L contendo mistura esterilizada de solo argiloso, esterco e areia quartzosa (2:1:1 v:v:v) foram semeadas oito sementes de cada acesso. Após a germinação, procedeu-se ao desbaste deixando-se quatro plântulas por vaso. Um vaso com quatro plantas estabelecidas representou uma unidade experimental. Cada ensaio foi estabelecido com 30 acessos inoculados com um isolado confrontante. Um total de seis isolados foi utilizado (Cgc002, Sapezal – MT; Cgc010, Viçosa – MG; Cgc019, Acreúna – GO; Cgc037, Santa Helena de Goiás – GO; Cgc061, Campo Verde – MT e Cgc097, Alto Taquari – MT). Vinte dias após a emergência das plantas, foi aplicada, com auxílio de pulverizador, suspensão de 1×10^5 conídios/mL nas folhas até o escorrimento.

Todos os ensaios foram avaliados aos 50 DAE, e em cada planta de cada repetição computou-se uma das três reações: I=Imune (sem lesões); R=Resistente (lesões apenas nas folhas, sem emissão de brotos) e S=Suscetível (lesões nas folhas e emissão de diversos brotos laterais no ápice da planta). As reações I e R foram consideradas apenas R para construção da matriz binária. Em caso de reações discrepantes (como três plantas S e uma R em uma repetição) foi considerado ter havido falha na inoculação por não ser esperada segregação nesses acessos. Em tais casos, o acesso foi considerado “S”. As reações foram comparadas para cada combinação isolado x acesso.

Selecionaram-se seis acessos (dois resistentes, dois suscetíveis e dois com reações diferentes em função do isolado), os quais foram alocados em uma ordem fixa, com denominações de A a F, conforme proposto por Habgood (1970). A reação de cada planta hospedeira a cada isolado foi computada usando 0 para resistência e 1 para suscetibilidade. A série resultante de reações para cada acesso (notação binária) foi convertida para notação decimal, cuja soma gera um número para cada raça.

RESULTADOS

Ensaio de linhagens. No ensaio de resistência à ramulose, houve diferença entre os tratamentos ($P < 0,0001$), os quais foram agrupados, pelo teste de Scott-Knott, em três grupos (Tabela 1). O primeiro grupo, formado por três genótipos, os valores de ω variaram de 32,52 a 41,05. O segundo grupo incluiu cinco genótipos, com valores de ω entre 49,57 e 57,77. Os 20 genótipos restantes foram agrupados no grupo mais suscetível. Houve correlação negativa entre o índice de ramulose e produtividade ($r = -0,733$, $P < 0,0001$). Das 60 plantas avaliadas, a linhagem 2984 teve 16 plantas com nota 1, 12 com nota 2, 25 com nota 3 e 3 com nota 4. Houve variação dos genótipos (linhagens) quanto à severidade da mancha de ramulária e mancha angular ($P = 0,0278$ e $P < 0,0001$, respectivamente). Todavia não houve correlação entre severidade de ramulária e produtividade ($r = -0,003$, $P = 0,978$). Houve correlação negativa entre severidade de mancha angular e produtividade ($r = -0,230$, $P = 0,035$). A incidência do mosaico das nervuras foi baixa, e não houve diferença entre os genótipos ($P = 0,670$), porém, houve correlação negativa entre porcentagem de plantas com virose e produtividade ($r = -0,244$, $P = 0,026$). As linhagens não diferiram quanto à altura média das plantas no ensaio de F+N ($P = 0,055$). Porém, a altura das plantas correlacionou-se à produtividade ($r = 0,421$, $P < 0,0001$) e apenas a linhagem CNPA GO 2001 - 3109 foi mais produtiva em produção de fibra que o controle resistente, BRS-Aroeira. Houve diferença significativa na porcentagem de fibra entre os genótipos testados ($P < 0,0001$) o que contribuiu para diferenças também na produção total de fibra. A variedade BRS-Aroeira teve o menor rendimento (média de 39,2 %). As linhagens CNPA GO 2001 - 3109 (43,3% de rendimento de fibra), CNPA GO 2001 -22 (41,3%), CNPA GO 2000 - 1167 (42,9%) e CNPA GO 2000 - 991 (42,9%) foram mais produtivas que BRS-Aroeira (Tabela 2). Houve diferença em duas das três características da fibra analisadas nas linhagens testadas. O comprimento de fibras e o índice de finura foram diferentes entre

as linhagens ($P=0,0001$ e $P=0,0003$, respectivamente). A resistência de fibra não diferiu entre os genótipos (Tabela 2).

O coeficiente de correlação entre índice de ramulose e produtividade, quando comparado aos demais coeficientes de correlação, foi significativamente mais alto, o que sugere que a redução em produtividade pela ramulose foi maior que todas as demais (Tabela 3 e Figura 1).

Ensaio BAG

Houve diferença entre os acessos inoculados com Cgc para as variáveis ω ($P=0,0029$) e produtividade ($P=0,0004$), e houve correlação negativa entre ω e a produtividade dos acessos estudados ($r=-0,651$, $P<0,0001$, Figura 2). Distinguiram-se quatro grupos de acessos com diferentes níveis de resistência à ramulose (Figura 3). No primeiro grupo ($F=463$, $T^2= 37,4$ e $CCC=-5,3$), formado por 28 acessos, ω variou de 11,97 a 38,04. O segundo ($F=475$, $T^2= 159$ e $CCC=-6,5$) foi formado por 44 acessos com ω entre 40,03 e 53,99. O terceiro ($F=709$, $T^2= 140$ e $CCC=-6,5$) incluiu 45 acessos com ω entre 55,53 e 73,70 e o último grupo ($F=262$, $T^2= 55,9$ e $CCC=-6,3$), formado por 23 acessos, com ω entre 75,95 e 106,54. O controle moderadamente resistente, variedade BRS-Aroeira, foi alocado no segundo grupo com média 45,22 e o controle suscetível, variedade Delta Opal, no terceiro grupo com média 66,21 (Tabela 6).

Quando os acessos foram agrupados com base na produtividade, quatro grupos distintos também foram identificados (Figura 4). No primeiro grupo ($n=21$, $F=249$, $T^2= 67,7$ e $CCC=-6,7$) a produtividade variou de 3.650 a 2.389 kg/ha. O segundo grupo ($n=45$, $F=368$, $T^2= 123$ e $CCC=-9,8$) incluiu os acessos com produtividade variando entre 2.316 e 1.517 Kg/ha. A variedade teste BRS-Aroeira foi incluída neste grupo (média de 1.929 kg/ha). O terceiro grupo ($n=53$, $F=507$, $T^2= 134$ e $CCC=-8,3$) foi formado por acessos com produtividade entre 1.467 e 855 kg/ha e incluiu-se a variedade suscetível Delta Opal (média de 1.328 kg/ha). O último grupo ($n=21$, $F=408$, $T^2= 88,7$ e $CCC=-6,3$) incluiu os acessos menos produtivos, com médias abaixo de 767 kg/ha, com cinco acessos que não produziram fibra.

Dos 28 acessos agrupados como mais resistentes, 14 também foram incluídos no grupo dos mais produtivos. Apesar de nenhum acesso avaliado ter reação imune, alguns acessos foram altamente resistentes. Em 16 de 20 plantas do acesso CNPA - 1689 não ocorreram sintomas e apenas quatro plantas desenvolveram os sintomas iniciais nas folhas (nota 2). O acesso CNPA - 3085 teve três plantas com nota 2 e uma planta com nota 4 (emissão de diversos brotos laterais), apesar de as demais plantas avaliadas não

desenvolverem sintomas. Provavelmente, ocorreu uma eventual mistura de sementes, pois as demais plantas não avaliadas na parcela não desenvolveram sintomas ou, quando desenvolveram, estes se limitaram a lesões nas folhas (nota 2). Das 20 plantas avaliadas do acesso CNPA – 6499, quatro não tiveram sintomas, nove tiveram lesões nas folhas e sete iniciaram emissão de brotos laterais (nota 3). O acesso CNPA - 6525 teve oito plantas sem sintomas, oito plantas com nota 2 e quatro plantas com nota 3. No acesso CNPA – 140, seis plantas foram assintomáticas, 11 plantas com nota 2 e três plantas com nota 3. Apesar de ser bastante produtivo, das 20 plantas avaliadas no acesso CNPA – 2910, apenas uma não teve sintomas, 9 foram avaliadas como nota 2, 9 nota 3 e uma planta com nota 4.

As características de fibra, resistência e micronaire, não diferiram entre as linhagens testadas. A resistência de fibra (gf/tex) é classificada como muito fraca (< 22), fraca (23-26), média (27-30), forte (31-33) ou muito forte (>34) (Santana *et al.*, 1999). Todas as linhagens tiveram fibra de forte a muito forte (Tabela 2). O índice de finura micronaire (µg/in) não variou entre as linhagens. Os valores mensurados para essa variável estão de acordo com os padrões atuais de qualidade de fibra. Todas as linhagens possuem fibra de normal a longas (acima de 35 mm).

Série diferenciadora

Dos 30 acessos testados, apenas dois tiveram reações diferentes em função do isolado do patógeno empregado na inoculação (Tabela 4). O acesso Texas 700, considerado resistente (Lima *et al.*, 1984), foi suscetível quando confrontado com os isolados Cgc010, Cgc019, Cgc037 e Cgc097. O acesso Clevevilt foi resistente aos isolados Cgc002, Cgc037 e Cgc061.

Com base nas reações avaliadas nos seis ensaios, foi possível selecionar seis acessos (dois resistentes, dois suscetíveis e dois com reações dependente do isolado do patógeno usado na inoculação) e aplicar a proposta de Habgood (1970) para designação de raças. Os acessos HR21 T-16 e HR 102 foram escolhidos por sua alta resistência e designados A e B, respectivamente. Os acessos Cooker 304 e BRS Cedro foram escolhidos por serem altamente suscetíveis e denominados C e D, respectivamente, e os acessos Texas 700 e Clevevilt foram escolhidos com base nas diferentes respostas dependente do isolado usado e denominados E e F, respectivamente. A reação de cada acesso a cada isolado foi anotada usando 0 para resistência e 1 para suscetibilidade. A série resultante de reações (número binário) foi convertida para notação decimal (Tabela 5). Com base nas reações obtidas com os seis isolados usados foi possível distinguir 3 raças enumeradas como 12, 28 e 60.

DISCUSSÃO

Foi possível identificar linhagens em fase final do programa de melhoramento e acessos pertencentes ao BAG com níveis aceitáveis de resistência à ramulose. Dentre as linhagens avaliadas como resistentes, a CNPA GO 2001-2984 teve o menor ω e a maior produtividade. Por ser uma linhagem selecionada em F_3 no ensaio de progênies de 2000/2001 e ter entrado nos ensaios de novas linhagens a partir de 2001, este genótipo ainda não está em plena homozigose, sendo possível realizar seleção em ciclos posteriores visando eliminar plantas com nota 3 ou 4. Esta linhagem é candidata a ser lançada como variedade com nível aceitável de resistência à ramulose, bem como outras características agronômicas desejáveis. Dos 28 acessos do BAG avaliados como resistentes à ramulose, 14 foram também mais produtivos. Os acessos do BAG com boas características de fibra e produção poderão ser usados como genitores em cruzamentos visando introgradir a resistência à ramulose em variedades elite.

Embora não quantificado nesse estudo, é notória a alta correlação positiva entre pilosidade e suscetibilidade à ramulose (Carvalho *et al.*, 1985). Em caso de segregação nas linhagens, uma abordagem de interesse seria realizar seleção usando pilosidade como marcador morfológico para eliminação de plantas suscetíveis.

A durabilidade da resistência à doenças é afetada pelo potencial evolutivo da população do patógeno (McDonald & Linde, 2002). Uma das maneiras de inferir sobre a população do patógeno baseia-se no monitoramento da ocorrência e o estudo da dinâmica de raças. Com base na possível existência de raças (Tanaka & Menten, 1992, Lima & Chaves, 1992), procurou-se em um conjunto de 30 acessos de algodoeiro, encontrar reações diferenciais conforme o isolado do patógeno usado. Dos acessos testados, apenas dois resultaram em diferentes reações conforme o isolado empregado. Considerando que, para esses isolados, a resposta foi consistente nas duas repetições e que o ensaio foi conduzido em condições de ambiente controlado, pode-se inferir que existe reação diferenciada, embora não tão evidente como uma resposta de hipersensibilidade. Não houve resposta imune em nenhum dos acessos testados, todavia, em alguns, apenas lesões nas folhas foram observadas. Partindo-se do conhecimento existente que a herança da resistência é recessiva e governada por dois genes de efeito principal, com efeito de genes modificadores (Carvalho *et al.*, 1988), pode-se supor que em tais genótipos não estão presentes alguns genes de efeito secundário. Ademais, em alguns acessos foi observada resposta intermediária na época da avaliação, quando

outros já atingiam o máximo de doença. No primeiro caso, algum gene de efeito principal pode estar ausente, enquanto no segundo caso, os genótipos não possuem ambos.

Genótipos adicionais poderão ser incluídos na série diferenciadora com o objetivo de distinguir raças às quais reações em todos os diferenciadores sejam de resistência. Estes novos diferenciadores deverão ser incluídos no final da série (esquerda) e seguir a ordem alfabética. Dessa forma, as raças “velhas” que não suplantarem a resistência dos novos diferenciadores permanecerão com suas designações anteriores, enquanto aqueles isolados que causarem doença receberão novas denominações. A ordem na qual os genótipos foram arranjados também facilita a interpretação da designação da raça, uma vez que apenas raças de número ímpar são patogênicas ao genótipo A e que as raças com número superior a 32 são patogênicas a F.

O sistema proposto foi baseado naquele adotado no patossistema *C. lindemuthianum* x *Phaseolus vulgaris* para uniformizar, e assim permitir comparações, entre os vários trabalhos de caracterização de raças (Pastor-Corrales, 1991). O mesmo poderá ser adotado para a determinação de variação fisiológica em isolados de Cgc.

A busca por resistência múltipla às doenças e pragas foi proposta por Bird (1982) e tem sido seguida no Brasil pelos programas de melhoramento genético do algodoeiro (Cia & Salgado, 1997; Freire & Costa, 1999). O melhoramento visando resistência a pragas e doenças é hoje a principal meta em programas em todo o mundo. Outro gargalo no melhoramento genético do algodoeiro é que a estreita base genética das atuais cultivares elite representa vulnerabilidade e os ganhos de produtividade estão estagnando a cada ciclo de seleção (Paterson *et al.*, 2004), sendo necessário, portanto, realizar cruzamentos envolvendo conjuntos gênicos mais divergentes e com novas fontes de resistência, e, se possível, com boas características de fibra.

Nesse trabalho, os genótipos variaram quanto à severidade da mancha angular. A variedade DELTA OPAL e as linhagens CNPA GO 2000-1167, CNPA GO 2001-3033, CNPA GO 2001-3031, foram resistentes. Por outro lado, valores de severidade superiores a 4 foram obtidos nas linhagens CNPA GO 2000-995 e CNPA GO 2001-22. São reconhecidos ao menos 18 genes, alguns de efeito principal, ou complexos de genes de efeitos secundários (genes *B*) de resistência a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Hillocks, 1992a). Estes genes conferem resistência durável quando piramidados em conjuntos gênicos contendo poligenes

(Brinkerhoff *et al.*, 1984). Em ensaios de linhagens avançadas e finais, a base genética é estreita pelo uso de poucos genótipos parentais. Esse pool gênico por ser pouco heterogêneo dificulta a seleção. No presente estudo, o fato de dois dos parentais envolvidos em cruzamentos que geraram as linhagens serem as variedades Delta Opal e FiberMax 966, imunes à mancha angular, deve ter contribuído para os baixos níveis de severidade observados, o que também explica a alta frequência de linhagens resistentes ao mosaico das nervuras, uma vez que Delta Opal também é imune a essa virose. Outras possibilidades são a desuniformidade da distribuição do vetor *Aphis gossypii* ou a baixa frequência de indivíduos virulíferos.

A infecção por *Ramularia areola* foi generalizada aos 99 DAE. A maioria das linhagens testadas foi suscetível à mancha de ramulária, o que deve ter contribuído para não ter havido correlação significativa entre a mancha de ramulária e produtividade. Todavia, não houve tratamento sem doença (controle) para se estimar a perda relativa ocasionada pela mancha de ramulária. Entretanto, houve valores de severidade entre 2,1 (linhagem CNPA GO 2001-1463) e 11,7 (variedade DELTA OPAL, de reconhecida suscetibilidade). Considerando-se esse intervalo, pode-se inferir que as linhagens CNPA GO 2000-1088, CNPA GO 2000-1093, CNPA GO 2000-1156, CNPA GO 2000-1167, CNPA GO 2001-3033, CNPA GO 2001-3076, CNPA GO 2001-2058, CNPA GO 2001-2984, com baixa severidade (notas inferiores a 4) podem ser empregadas em esquemas de manejo envolvendo menor número de pulverizações com fungicidas.

As condições drásticas de inoculação de Cgc (ensaio ramulose) e cultivo de algodão em área altamente infestada por F+N contribuíram para os maiores impactos dessas doenças sobre a produção de algodão. A PPV e a mancha angular tiveram baixa correlação negativa com produtividade, apesar de nenhuma das linhagens ter sido muito suscetível às duas doenças.

O complexo F+N também reduziu a altura das plantas e contribuiu para redução em produtividade. Apesar de o ensaio ter sido realizado em campo, e, portanto sem maior uniformidade da distribuição dos patógenos, essa abordagem é válida para testar resistência de genótipos sob uma condição extrema. Apesar de a produção de algumas linhagens ter sido satisfatória, os valores obtidos estão aquém do desejado. Há, portanto, necessidade de se introgridir genes de fontes de resistência já identificados, como Auburn 623 para *M. incognita* e Auburn 56 para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Bridge, 1992; Hillocks, 1992b), esta última com boas características agrônômicas.

Tabela 1. Reação de linhagens e cultivares de algodoeiro à ramulose (Rlose), ao mosaico das nervuras (Vir), à mancha angular (Bact), mancha de ramulária (Rlaria) em Santa Helena de Goiás, GO e altura de plantas em Acreúna, GO.

Linhagem/Cultivar	Rlose¹ ω	Vir Incidência	Bact (Severidade)	Rlaria (Severidade)	Altura² (cm)
CNPA 2001 - 2984	32,52 a	0,30 a	0,83 a	2,92 a	97,00 a
CNPA 2000 - 1077	36,60 a	1,58 a	3,33 b	5,42 a	107,33 b
CNPA 2000 - 1072	41,05 a	2,58 a	3,75 b	6,67 b	108,00 b
CNPA 2001 - 1463	49,57 b	1,47 a	0,83 a	2,08 a	106,67 b
CNPA 2001 - 1335	54,31 b	0,29 a	0,83 a	5,00 a	109,00 b
CNPA 2001 - 1375	55,25 b	2,28 a	0,42 a	4,17 a	104,00 b
CNPA 2000 - 1021	57,69 b	0,54 a	2,08 b	8,33 b	101,00 b
CNPA 2000 - 1167	57,77 b	1,01 a	0,00 a	3,75 a	102,67 b
CNPA 2001 - 3109	63,33 c	0,73 a	0,42 a	4,58 a	104,00 b
CNPA 2000 - 995	63,35 c	1,50 a	4,17 b	7,50 b	89,33 a
BRS AROEIRA	66,64 c	0,25 a	1,25 a	9,17 b	106,33 b
CNPA 2001 - 2214	67,16 c	4,19 a	2,92 b	7,50 b	92,33 a
CNPA 2001 - 2099	68,13 c	0,96 a	2,92 b	5,42 a	106,33 b
CNPA 2001 - 2058	68,14 c	1,59 a	0,42 a	2,92 a	93,00 a
CNPA 2001 - 3031	69,60 c	0,46 a	0,00 a	7,08 b	105,00 b
CNPA 2000 - 1174	70,12 c	1,54 a	0,42 a	6,67 b	92,67 a
CNPA 2001 - 3076	70,19 c	1,15 a	2,10 b	2,92 a	109,33 b
CNPA 2001 - 22	70,90 c	0,31 a	4,17 b	10,00 b	112,67 b
BRS IPÊ	72,83 c	1,10 a	2,92 b	5,00 a	98,67 a
CNPA 2000 - 1156	73,04 c	0,92 a	1,25 a	3,33 a	101,33 b
CNPA 2000 - 1093	74,41 c	0,37 a	1,67 a	2,92 a	105,00 b
CNPA 2000 - 1088	74,58 c	0,48 a	2,50 b	3,33 a	106,33 b
CNPA 2000 - 991	76,29 c	1,36 a	3,33 b	5,83 a	98,67 a
CNPA 2000 - 1256	76,64 c	1,03 a	0,83 a	5,83 a	95,00 a
CNPA 2001 - 2161	77,73 c	0,00 a	3,33 b	8,33 b	93,33 a
CNPA 2001 - 3033	79,04 c	0,00 a	0,00 a	2,50 a	107,00 b
DELTA OPAL	81,36 c	0,58 a	0,00 a	11,67 b	100,67 b
CNPA 2000 - 999	83,65 c	0,49 a	3,33 b	6,67 b	97,67 a
	65,43	1,04	1,79	5,625	101,7976
CV	15,58	161,98	57,15	56,183	8,1317
P	0,0001	0,67	0,0001	0,0278	0,0548

1 = Severidade de ramulose (ω = transformação angular do índice de infecção, Amaral, 1969) 2 = Determinada em solo naturalmente infestado por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, α=0,05). CV = coeficiente de variação. P = nível de significância.

Tabela 2. Produtividade de algodão em caroço de linhagens de algodoeiro e cultivares inoculadas artificialmente com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, naturalmente infestadas por *R. areola*, e produtividade e características de fibra de linhagens cultivadas em solo naturalmente infestado por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*.

Linhagem/Cultivar	Rend¹ (Kg/ha)	Rend² (Kg/ha)	RendF³ (Kg/ha)	Fibra (%)	Len⁴ (mm)	Str⁵ (gf/tex)	Mic⁶ (µg/in)
BRS AROEIRA	1686,67 a	3647,67 b	1476,67 a	39,17 a	31,13 b	32,00 a	4,40 a
BRS IPÊ	550,00 a	3194,33 a	1314,00 a	40,07 a	29,93 a	33,63 a	4,70 b
DELTA OPAL	704,00 a	3401,33 a	1338,33 a	42,60 c	30,70 a	31,90 a	4,63 b
CNPA 2000 - 995	1577,33 a	3731,00 b	1276,33 a	42,17 c	29,70 a	31,80 a	4,53 b
CNPA 2000 - 999	281,67 a	3375,67 a	1278,67 a	41,60 b	29,50 a	31,83 a	4,40 a
CNPA 2000 - 1021	1183,33 a	4018,00 b	1093,67 a	40,53 a	30,40 a	34,70 a	4,83 b
CNPA 2000 - 1072	1474,33 a	3488,33 a	1372,00 a	40,53 a	33,00 c	32,13 a	4,60 b
CNPA 2000 - 1077	1216,67 a	3377,33 a	1346,00 a	41,07 b	32,47 c	35,80 a	4,37 a
CNPA 2000 - 1088	411,33 a	3412,67 a	1238,33 a	43,80 d	29,10 a	30,47 a	4,87 b
CNPA 2000 - 1093	416,67 a	3025,67 a	1457,33 a	44,23 d	29,73 a	35,13 a	4,73 b
CNPA 2000 - 1156	603,67 a	4051,33 b	1471,00 a	43,23 c	30,43 a	31,70 a	4,80 b
CNPA 2000 - 1167	1766,67 a	3405,33 a	1519,33 a	42,90 c	30,57 a	30,60 a	4,60 b
CNPA 2000 - 1174	420,33 a	3864,33 b	1390,67 a	39,63 a	31,80 b	35,50 a	4,30 a
CNPA 2000 - 1256	777,67 a	3771,67 b	1319,00 a	41,90 b	30,20 a	33,80 a	4,70 b
CNPA 2000 - 991	344,33 a	3459,00 a	1479,67 a	42,87 c	30,37 a	32,20 a	4,47 a
CNPA 2001 - 3033	314,67 a	3381,33 a	1337,33 a	41,77 b	31,10 b	36,03 a	4,17 a
CNPA 2001 - 3076	949,67 a	3438,33 a	1363,33 a	43,30 c	31,50 b	34,67 a	4,70 b
CNPA 2001 - 22	565,00 a	3677,33 b	1522,33 a	41,30 b	32,00 b	35,80 a	4,37 a
CNPA 2001 - 1335	1927,33 a	3657,00 b	1452,67 a	43,17 c	30,43 a	33,03 a	4,50 b
CNPA 2001 - 1375	1418,00 a	3685,00 b	1443,33 a	40,80 b	31,30 b	30,13 a	4,50 b
CNPA 2001 - 1463	2118,33 a	4205,00 b	1408,33 a	41,37 b	30,57 a	33,20 a	4,67 b
CNPA 2001 - 2058	1133,00 a	3775,67 b	1189,33 a	42,10 c	29,67 a	33,23 a	4,17 a
CNPA 2001 - 2099	607,00 a	3581,00 a	1282,00 a	41,77 b	30,13 a	33,03 a	4,73 b
CNPA 2001 - 2161	479,33 a	3890,33 b	1286,67 a	42,43 c	29,97 a	28,13 a	4,43 a
CNPA 2001 - 2214	827,67 a	3790,33 b	1013,33 a	39,57 a	29,70 a	32,80 a	4,00 a
CNPA 2001 - 2984	2322,00 a	4029,00 b	1351,33 a	44,57 d	30,53 a	31,83 a	4,63 b
CNPA 2001 - 3031	1209,00 a	3875,67 b	1290,00 a	40,90 b	31,63 b	33,33 a	4,13 a
CNPA 2001 - 3109	1164,67 a	3070,00 a	1636,67 a	43,30 c	31,50 b	33,80 a	4,13 a
	1016,08	3617,13	1355,27	41,88	30,68	32,937	4,502
CV	93,33	10,99	16,61	1,806	2,250	9,188	5,282
P	0,3125	0,0532	0,4577	0,0001	0,0001	0,285	0,0003

1 = rendimento de algodão em caroço (kg/ha) ensaio Ramulose; 2 = rendimento de algodão em caroço (kg/ha) ensaio Mancha de ramulária; 3 = rendimento de fibra (kg/ha) ensaio F+N; 4 = comprimento de fibra (mm); 5 = resistência de fibra (gf/tex); 6 = Finura - índice Micronaire (µg/pol). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, $\alpha=0,05$). CV = coeficiente de variação. P = nível de significância.

Tabela 3. Probabilidade da comparação entre coeficientes de correlação (intensidade de doença versus produtividade)

	Rlose x prod (r=-0,733)	Rlaria x prod (r=-0,003)	Bac x prod (r=-0,230)	PPV x prod (r=-0,244)
Rlaria x prod (r=-0,003)	P>0,0001			
Bac x prod (r=-0,230)	P>0,0001	P=0,141		
PPV x prod (r=-0,244)	P>0,0001	P=0,118	P=0,928	
F+N x prod (r=0,421)	P>0,0001	P=0,0040	P>0,0001	P>0,0001

Rlose = Ramulose; Rlaria = Mancha de ramulária; Bac = Mancha angular; PPV = Porcentagem de plantas com mosaico das nervuras; F+N = Complexo *F. oxysporum* f. *sp. vasinfectum*.

Tabela 4. Reação de 30 acessos de algodoeiro a seis isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Acesso	Isolados					
	002	010	019	037	061	097
Reba B-50	S	S	S	S	S	S
TASHKENT	S	S	S	S	S	S
HANCOCK	S	S	S	S	S	S
HR21 T16	R	R	R	R	R	R
Texas 700	R	S	S	S	R	S
Coker 304	S	S	S	S	S	S
Del Cerro 1959	S	S	S	S	S	S
Empire glandless	S	S	S	S	S	S
Dixie King II	S	S	S	S	S	S
NR 6551	S	S	S	S	S	S
Deltapine Smooth Leaves	R	R	R	R	R	R
IAC – RM 2	S	S	S	S	S	S
Cleviewilt	R	S	S	R	R	S
149F	S	S	S	S	S	S
Gregg 35 W	S	S	S	S	S	S
LSS	S	S	S	S	S	S
AH(67)M	S	S	S	S	S	S
HR 102	R	R	R	R	R	R
Allen 333-57	S	S	S	S	S	S
Cacique	S	S	S	S	S	S
Lousiana Okra – 2	S	S	S	S	S	S
T – 16	S	S	S	S	S	S
SU 0450	S	S	S	S	S	S
Texas	S	S	S	S	S	S
Bayon SN – 1	S	S	S	S	S	S
BRS Cedro	S	S	S	S	S	S
HL 1	S	S	S	S	S	S
North Carolina Smooth 1	R	R	R	R	R	R
Pima S 7	S	S	S	S	S	S
J. BREBBIA 830	S	S	S	S	S	S

Tabela 5. Denominação de três raças de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em seis acessos de algodoeiro segundo Habgood (1970).

Isolado	Acesso						Soma	Raça
	Cleve	Texas	BRS	Coker	HR	HT21		
	wilt F(2 ⁵)	700 E (2 ⁴)	Cedro D (2 ³)	304 C (2 ²)	102 B (2 ¹)	T16 A (2 ⁰)		
002	R (0)	R (0)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	8+4	12
010	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	32+16+8+4	60
019	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	32+16+8+4	60
037	R (0)	S (1)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	16+8+4	28
061	R (0)	R (0)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	8+4	12
097	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)	R (0)	R (0)	32+16+8+4	60

Figura 1. Valores de ω para ramulose (A), incidência de plantas com virose (B), severidade de mancha de ramulária (C), severidade de mancha angular (D) e altura média de plantas (E) em função da produtividade em linhagens de algodoeiro.

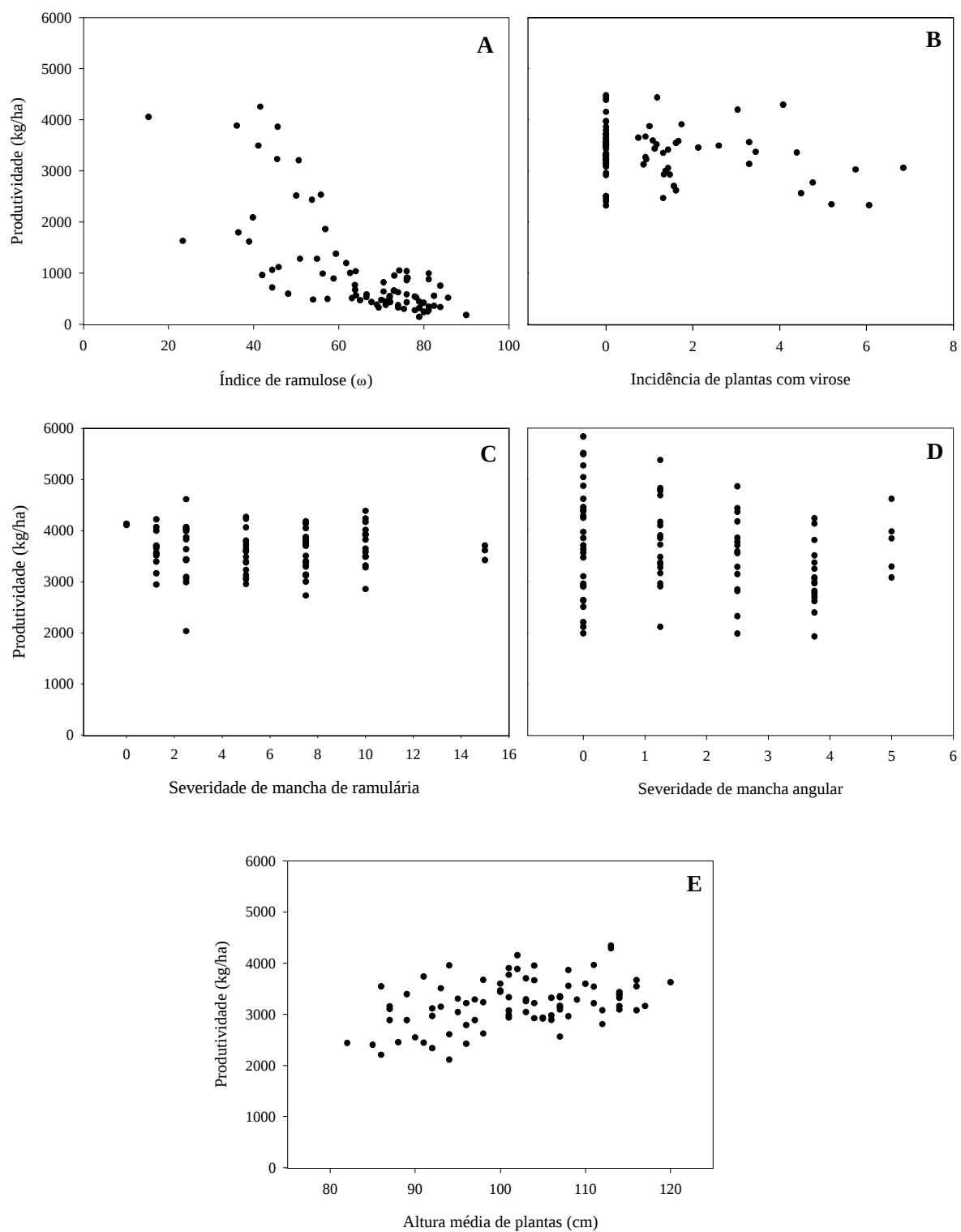


Figura 2. Relação entre valores de ω e produtividade no ensaio de seleção de acessos (BAG) para resistência à ramulose.

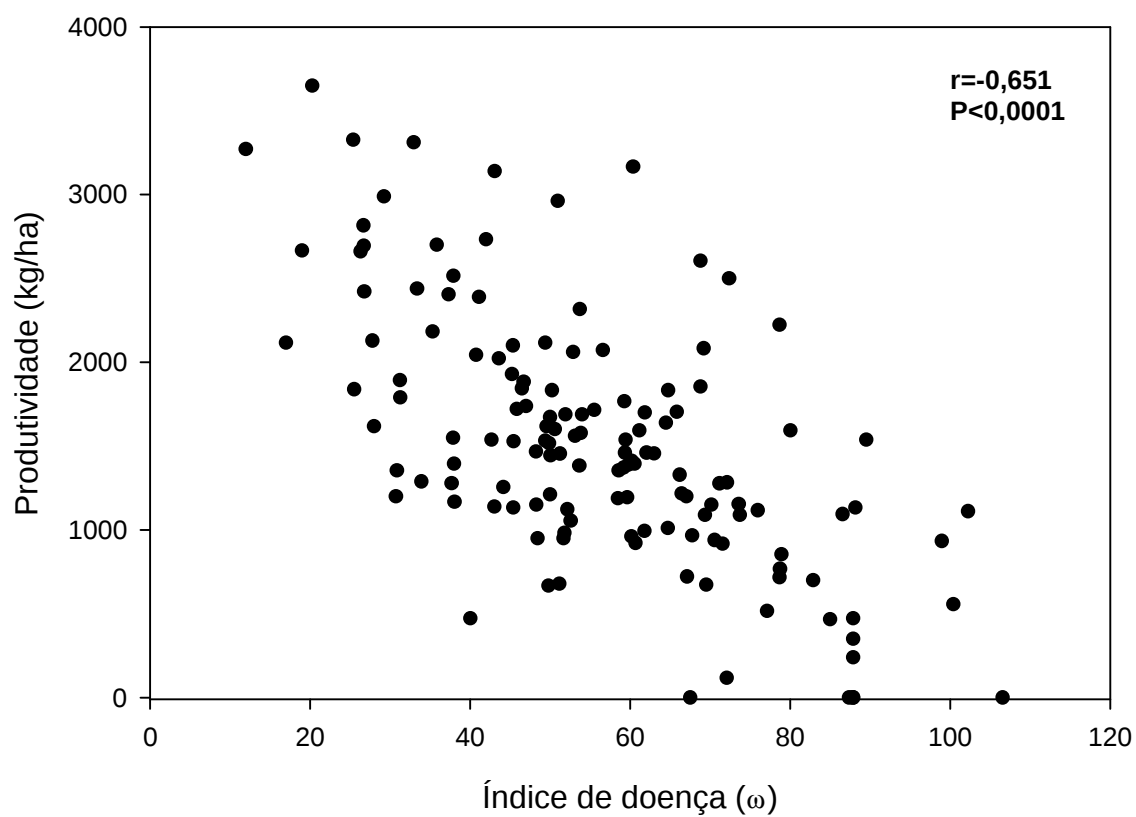


Tabela 6. Acessos do Banco Ativo de Germoplasma usados no ensaio para seleção de resistência à ramulose, valores de w e produtividade (kg/ha). Acessos estão listados em ordem decrescente de produtividade.

Trat.	Acesso	w	Kg/ha	Trat.	Acesso	w	Kg/ha
108	CNPA - 140	20,28	3650	63	CNPA - 7742	46,70	1883
16	CNPA - 1689	25,39	3327	19	CNPA - 2043	68,79	1855
109	CNPA - 2910	32,93	3311	68	CNPA - 7836	46,47	1844
110	CNPA - 3085	11,97	3272	118	CNPA - 8196	25,49	1839
13	CNPA - 1411	60,37	3166	40	CNPA - 4785	64,77	1833
39	CNPA - 4725	43,06	3139	51	CNPA - 5998	50,21	1833
45	CNPA - 5432	29,22	2989	115	CNPA - 7835	31,25	1789
15	CNPA - 1622	50,95	2961	113	CNPA - 7595	59,28	1766
80	CNPA - 8424	26,67	2816	100	CNPA - 6353	47,00	1739
59	CNPA - 7315	42,00	2733	49	CNPA - 5847	45,82	1722
26	CNPA - 3397	35,84	2700	27	CNPA - 3453	55,53	1716
96	CNPA - 6304	26,72	2694	47	CNPA - 5695	65,83	1705
105	CNPA - 6525	18,99	2666	64	CNPA - 7764	61,83	1700
7	CNPA - 71	26,31	2661	67	CNPA - 7831	54,00	1689
17	CNPA - 1691	68,79	2605	116	CNPA - 7902	51,92	1689
81	CNPA - 8477	37,91	2516	85	CNPA - 8752	50,01	1672
34	CNPA - 4067	72,36	2500	130	DLP 50	64,48	1639
35	CNPA - 4118	33,37	2439	104	CNPA - 6522	27,98	1617
42	CNPA - 4979	26,77	2422	106	CNPA - 6596	49,56	1617
53	CNPA - 6007	37,30	2405	30	CNPA - 3663	50,61	1600
127	BRS SUCUPIRA	41,11	2389	24	CNPA - 3131	80,03	1594
124	BRS ANTARES	53,70	2316	28	CNPA - 3533	61,15	1594
11	CNPA - 1309	78,69	2222	38	CNPA - 4680	53,83	1578
121	IAC 24	35,31	2183	62	CNPA - 7718	53,11	1561
56	CNPA - 6886	27,78	2128	48	CNPA - 5741	37,89	1550
65	CNPA - 7790	49,40	2116	14	CNPA - 1598	89,51	1539
103	CNPA - 6499	16,97	2116	50	CNPA - 5991	42,69	1539
107	CNPA - 6354	45,34	2100	86	CNPA - 8756	59,44	1539
33	CNPA - 4015	69,20	2083	57	CNPA - 7304	49,38	1533
8	CNPA - 864	56,61	2072	139	CNPA PRECOCE 1	45,43	1528
60	CNPA - 7471	52,85	2061	97	CNPA - 6320	49,85	1517
75	CNPA - 8132	40,73	2044	6	CNPA - 69	48,23	1467
54	CNPA - 6013	43,60	2022	73	CNPA - 8022	59,37	1461
T1	BRS-Aroeira	45,22	1930	111	CNPA - 5040	62,05	1461
77	CNPA - 8319	31,23	1894	140	ACALA SM3	62,98	1455
41	CNPA - 4889	51,23	1455	137	STO 132 R	69,34	1089
83	CNPA - 8670	50,05	1444	55	CNPA - 6014	52,56	1055
112	CNPA - 7434	60,20	1411	76	CNPA - 8202	64,71	1011
44	CNPA - 2957	38,01	1394	84	CNPA - 8749	61,78	994
58	CNPA - 7312	60,53	1394	120	CNPA - 8846	51,79	983
66	CNPA - 7798	59,79	1389	78	CNPA - 8380	67,77	967
82	CNPA - 8598	53,65	1383	43	CNPA - 5001	60,16	961
2	BRS-Ipê	67,30	1372	95	CNPA - 6270	51,69	950
117	CNPA - 7946	59,20	1372	119	CNPA - 8463	48,43	950
5	CNPA - 41	58,58	1355	46	CNPA - 5494	70,55	939
91	CNPA - 8847	30,85	1355	21	CNPA - 2432	98,95	933
T2	Delta Opal	66,21	1328	52	CNPA - 6006	60,67	922
98	CNPA - 6345	33,93	1289	70	CNPA - 7962	71,55	917
125	TANCOT SPINKS	72,12	1283	29	CNPA - 3437	78,90	855
99	CNPA - 6350	37,69	1278	31	CNPA - 3736	78,72	767
138	CHACO 520	71,17	1278	72	CNPA - 7997	67,12	722
93	CNPA - 6252	44,14	1255	114	CNPA - 7692	78,67	717
131	SUREGROW 404	66,43	1217	37	CNPA - 4565	82,87	700
79	CNPA - 8406	49,99	1211	94	CNPA - 6268	51,14	678
101	CNPA - 6385	30,72	1200	61	CNPA - 7634	69,52	672
135	HR 102	67,02	1200	134	ACALA SJ 5	49,78	667
32	CNPA - 3778	59,62	1194	10	CNPA - 1308	100,40	556
88	CNPA - 8800	58,48	1189	123	BRS ACALA	77,11	517
102	CNPA - 6489	38,04	1167	126	PIMA S - 5	40,03	472
71	CNPA - 7984	73,58	1155	136	DP ACALA 90	87,88	472
69	CNPA - 7954	70,16	1150	23	CNPA - 2987	84,99	467
74	CNPA - 8105	48,28	1150	133	KARNAK	87,88	350
122	BRS 97-1067	43,05	1139	4	CNPA - 13	80,03	239
22	CNPA - 2471	88,14	1133	128	Empire Glandless	87,88	239
92	CNPA - 6251	45,40	1133	89	CNPA - 8833	72,07	117
87	CNPA - 8769	52,15	1122	18	CNPA - 2791	106,54	0
25	CNPA - 3310	75,95	1117	36	CNPA - 4517	87,36	0
12	CNPA - 1336	102,24	1111	90	CNPA - 8815	67,50	0
20	CNPA - 2418	86,54	1094	129	IAC 19	87,88	0
9	CNPA - 1130	73,70	1089	132	AUBURN 56	87,88	0

Figura 3. Agrupamento de acessos (BAG) com base nas médias de índice de doença (ω) de ramulose.

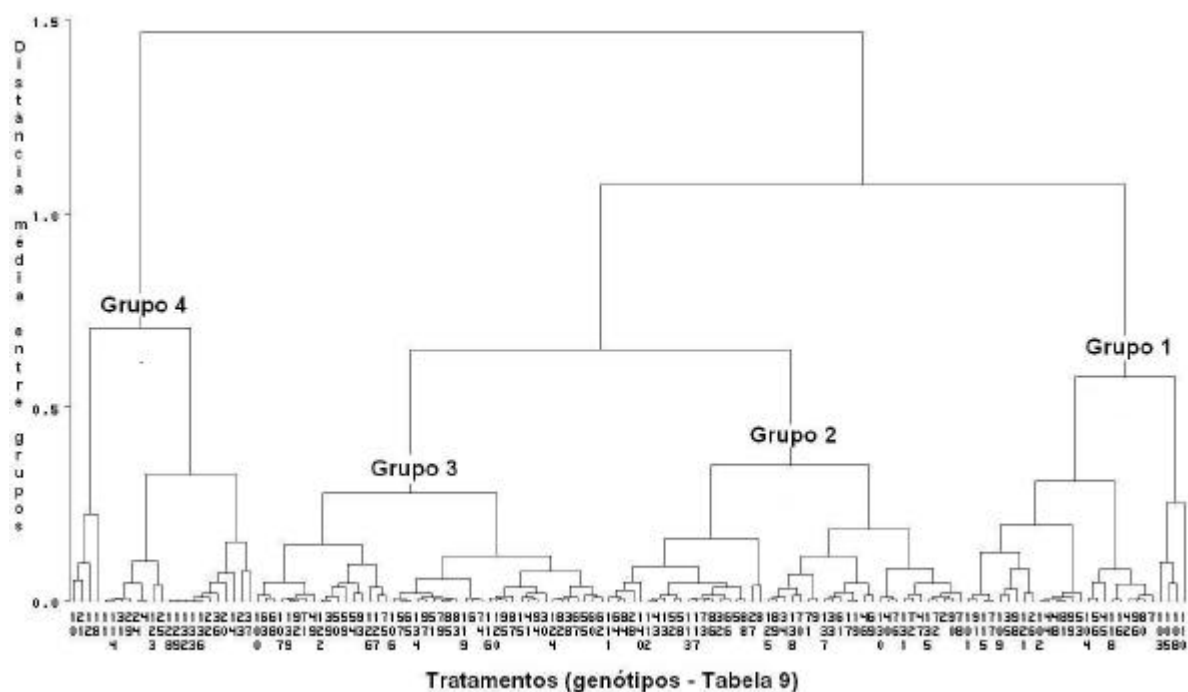
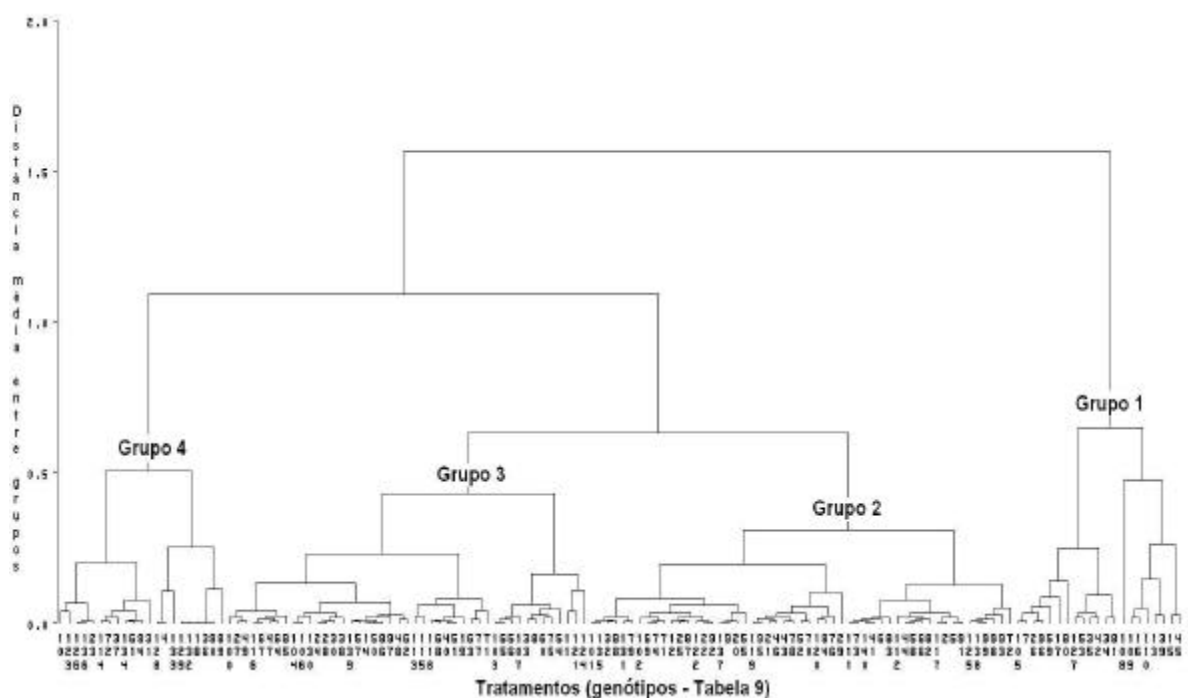


Figura 4. Agrupamento de acessos (BAG) com base nas médias de produtividade em ensaio inoculado com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, E. Novo índice de intensidade de infecção. Pesquisa Agropecuária Brasileira 4: 1-2. 1969.
- Araújo, A. E. Doenças da cultura do algodoeiro no cerrado. CONGRESSO INTERNACIONAL DO AGRONEGÓCIO DO ALGODÃO, Cuiabá-MT. 2000.
- Araújo, A. E. & Suassuna, N. D. Guia de identificação e controle das principais doenças do algodoeiro no Estado de Goiás. Embrapa Algodão. Documentos, 113 40 p. 2003.
- Araújo, A. E., Suassuna, N. D., Freitas, J. S. & Farias, F. J. C. Escala de notas para avaliação de doenças foliares do algodoeiro. IV Congresso Brasileiro de Algodão, Goiânia - GO. 2003.
- Bird, L. S. Cotton. In: R. R. Nelson (Ed.) Breeding plants for disease resistance - concepts and applications. Pennsylvania. Pennsylvania State University Press. 1973. pp. 181-198.
- Bird, L. S. The MAR (multi-adversity resistance) system. Plant Disease 66: 172-176. 1982.
- Bridge, J. Nematodes. In: R. J. Hillocks (Ed.) Cotton Diseases. Wallingford. CAB International. 1992. pp. 331-353.
- Brinkerhoff, L. A., Verhalen, L. M., Johnson, W. M., Essenberg, M. & Richardson, P. E. Development of immunity to bacterial blight of cotton and its implications for other diseases. Plant Disease 68: 168-173. 1984.
- Carvalho, L. P., Cruz, C. D., Moraes, C. F. & Lima, E. F. Hereditariedade da resistência do algodoeiro à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa. Ceres 41: 245-262. 1994.
- Carvalho, L. P., Lima, E. F., Carvalho, J. M. F. C. & Moreira, J. A. M. Herança da resistência à ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*). Fitopatologia Brasileira 13: 10-15. 1988.
- Carvalho, L. P., Lima, E. F., Ramalho, F. S., Lukefahr, M. J. & Carvalho, J. M. F. C. Influência da pilosidade do algodoeiro na expressão de sintomas de ramulose. Fitopatologia Brasileira 10: 649-654. 1985.
- Cia, E. & Salgado, C. L. Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: H. E. Kimati (Ed.) Manual de Fitopatologia. 1997. pp. 33-48.
- Costa, A. S. Investigações sobre a ramulose. Relatório: Seção de Algodão. Campinas - SP, Instituto Agrônomo de Campinas: 1-42. 1941.
- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Sobre a natureza da "ramulose" ou "superbrotamento" do algodoeiro. Jornal de Agronomia 2: 151-160. 1939.

- Czermainski, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de doenças em plantas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1545-1555. 1999.
- Dias, L. A. S. Análises Multidimensionais. In: A. C. Alfenas (Ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa. Editora UFV. 1998. pp. 405-475.
- Federer, W. T. Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. *Biometrics* 20: 540-552. 1961.
- Freire, E. C. & Costa, J. N. Objetivos e métodos utilizados nos programas de melhoramento do algodão no Brasil. In: N. E. M. Beltrão (Ed.) *O Agronegócio do Algodão no Brasil*. Brasília. Embrapa Comunicação e Transferência de Tecnologia. 1999. pp. 271-293.
- Habgood, R. M. Designation of physiological races of plant pathogens. *Nature* 227: 1268-1269. 1970.
- Hillocks, R. J. Bacterial blight. In: R. J. Hillocks (Ed.) *Cotton Diseases*. Wallingford. CAB International. 1992a. pp. 39-85.
- Hillocks, R. J. Fusarium wilt. In: R. J. Hillocks (Ed.) *Cotton Diseases*. Wallingford. CAB International. 1992b. pp. 127-160.
- Kist, B. B., Reetz, E., Santos, C., Beling, R. R. & Corrêa, S. *Brazilian Cotton Yearbook*. ed. Santa Cruz do Sul - RS. Gazeta Santa Cruz. 2004.
- Lima, E. F., Batista, F. A. S. & Vieira, R. M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle. In: N. E. M. Beltrão (Ed.) *O Agronegócio do Algodão no Brasil*. Brasília. EMBRAPA. 1999. pp. 716-752.
- Lima, E. F., Carvalho, L. P., Santos, E. O. & Carvalho, J. M. F. C. Avaliação de germoplasma de algodoeiro para resistência à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 9: 561-565. 1984.
- Lima, E. F. & Chaves, G. M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 17: 61-66. 1992.
- Malaguti, G. La escobilla del algodón en Venezuela. *Agronomia Tropical* 5: 73-86. 1955.
- Mathieson, J. T. & Mangano, V. Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Summa Phytopathologica* 11: 115-118. 1985.
- McDonald, B. A. & Linde, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124: 163-180. 2002.
- Miranda, J. E. & Suassuna, N. S. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Embrapa Algodão: Circular Técnica 76 48. 2004.

- Pastor-Corrales, M. A. Estandarizacion de variedades diferenciales y de designacion de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology* 81: 694. 1991.
- Paterson, A. H., Boman, R. K., Brown, S. M., Chee, P. W., Gannaway, J. R., Gingle, A. R., May, O. L. & Smith, C. W. Reducing the genetic variability of cotton. *Crop Science* 44: 1900-1901. 2004.
- Santana, J. C. F., Vanderley, M. J. R., Beltrão, N. E. M. & Vieira, D. J. Características da fibra e do fio do algodão: análise e interpretação dos resultados. In: N. E. M. Beltrão (Ed.) *O Agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília. Embrapa Comunicação e Transferência de Tecnologia. 1999. pp. 855-880.
- Scott, A. J. & Knott, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30: 507-512. 1974.
- Scott, R. A. & Milliken, G. A. A SAS program for analyzing augmented randomized complet-block designs. *Crop Science* 33: 865-867. 1993.
- Tanaka, M. A. S. & Menten, J. O. M. Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gosssypii* var. *cephalosporiodes* em algodoeiro. *Summa Phytopathologica* 18: 138-177. 1992.

Estrutura Genética de Populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Nelson D. Suassuna^{1*}, Carlos H. S. G. Meneses¹, Luiz A. Maffia², Eduardo S. G. Mizubuti²

¹Embrapa Algodão. Rua Osvaldo Cruz 1143 Centenário – CP 174 CEP 58107-720 Campina Grande – PB, e-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br; ²Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa – MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Nelson D. Suassuna

SUASSUNA, N. D., MENESES, C. H. S. G., MAFFIA, L. A. & MIZUBUTI, E. S. G. Estrutura genética de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

A ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma das principais doenças do algodoeiro no Brasil. Estudos foram conduzidos com 133 isolados visando elucidar a estrutura genética de populações do patógeno em três regiões produtoras de algodão que diferem quanto ao tempo de cultivo. Um total de 23 locos AFLP foram analisados e detectou-se baixa diversidade genética total ($H_t=0,139$) e baixa diversidade genética dentro de subpopulações ($H_s=0,133$). O número médio de migrantes foi estimado em 11,9 indivíduos a cada geração entre as três subpopulações. Não foi observada formação de estrutura sexuada (peritécio) *in vitro* após pareamento de 17 isolados em todas as combinações possíveis. Apenas um grupo de compatibilidade vegetativa foi identificado com base em testes de complementação usando 76 mutantes auxotróficos na rota de metabolismo do nitrato. Um mutante não formou heterocáion e também foi auto-incompatível. A diversidade genotípica variou entre subpopulações e um haplotipo foi mais freqüente em todas as subpopulações estudadas. Não houve correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos isolados. Há evidências que a população estudada de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tem estrutura clonal, com ausência de grupos de compatibilidade vegetativa e sem aparente reprodução sexuada. Ocorre grande fluxo gênico e sementes infectadas desempenham importante papel na dispersão do patógeno, principalmente para áreas novas.

ABSTRACT

Ramulose, caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, is one of the most important fungal diseases of cotton in Brazil. Pathogen population structure was investigated by analyzing 133 isolates collected from three major cotton producing areas. A total of 23 AFLP loci were analyzed. The total and within subpopulation genetic diversity were low, $H_t = 0.139$ and 0.133 , respectively. The estimated average number of migrants among the subpopulations, per generation, was 11.9. No sexual structure (perithecium) was formed in crosses established *in vitro* for 17 isolates in all possible combinations. A single vegetative compatibility group (VCG) was identified based on complementation tests using 76 auxotrophic mutants in nitrate metabolic pathway. One mutant did not form heterokarion and was self-incompatible. Genotypic diversity varied among subpopulations and one haplotype was found in high frequency in all subpopulations. There was no correlation between genetic and geographic distances. There is strong evidence that the population of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* analyzed in this study has a clonal structure, with no VCG, and sexual reproduction does not seem to play an important role. Gene flow among subpopulations is high and infected seeds are important to pathogen introduction/dispersal into new areas.

INTRODUÇÃO

A ramulose é uma das principais doenças do algodoeiro no Brasil e ocorre em todas as áreas produtoras do país (Araújo, 2000, Miranda & Suassuna, 2004). Toda a parte aérea do algodoeiro pode ser afetada em qualquer estágio de desenvolvimento, o que acarreta em redução da produção de fibra. Inicialmente, são formadas lesões necróticas em folhas jovens, mais tarde, quando o patógeno infecta a região meristemática, há perda da dominância apical e gemas laterais brotam. A emissão excessiva de ramos laterais é conhecida como “superbrotamento”. Em anos em que as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento de epidemias (períodos prolongados de alta umidade e chuva abundante) as perdas de produção podem ultrapassar 80% (Lima *et al.*, 1999).

Das lesões necróticas formadas nas folhas é possível isolar fungo do gênero *Colletotrichum* (Costa & Fraga Jr., 1937), o qual foi denominado *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), com morfologia similar à descrita para *C. gossypii*, todavia com características patogênicas distintas. Apenas Cgc é capaz de incitar “superbrotamento” (Costa, 1939) e por essa razão é considerado como o agente causal da ramulose.

A espécie *C. gossypii* causa a antracnose do algodoeiro (Atkinson, 1891) e é considerada a forma anamórfica de *Glomerella gossypii* (Edgerton, 1909). Diferenças em requerimento de nutrientes e morfologia de crescimento entre *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* têm sido relatadas (Pizzinatto & Tanaka, 1996, Tanaka *et al.*, 1996a, Tanaka *et al.*, 1996b). Sabe-se, também, que Cgc possui considerável variação cultural e patogênica (Lima & Chaves, 1992). Até o presente, há apenas um relato de um isolado de Cgc que desenvolveu a fase teleomórfica em condições controladas (Roca *et al.*, 2004). O estudo da fase perfeita do patógeno é importante para elucidar a etiologia da doença. Para este propósito, faz-se necessária a análise detalhada sobre a espécie do agente causal.

O conceito biológico de espécie não se aplica de forma irrestrita aos fungos que se reproduzem apenas de maneira assexuada, principalmente os fungos mitospóricos, pois não há como avaliar o cruzamento e a fertilidade da progênie. Tradicionalmente, a delimitação de espécies de fungos mitospóricos é realizada com base em critérios morfológicos, baseado na pressuposição que estes refletem relações filogenéticas ou evolutivas entre as espécies (Correll *et al.*, 2000). O modo de reprodução de muitas populações de *Colletotrichum* é principalmente, ou exclusivamente, assexuado. Porém,

espécies de *Colletotrichum* são altamente variáveis, quanto à morfologia de colônia, forma de conídio, presença de setas e apressórios, pigmentação, resistência a fungicidas entre outras (Correll *et al.*, 2000). É possível que outros processos como mutação e recombinação mitótica possam ocorrer e contribuir para a alta variabilidade das populações de *Colletotrichum* spp.

A compatibilidade vegetativa entre isolados permite que haja troca de material genético via ciclo parassexual (Correll *et al.*, 2000). O termo compatibilidade vegetativa refere-se à habilidade de isolados fúngicos sofrerem anastomose de hifas e resultar em células viáveis contendo núcleos de ambos os parentais em um citoplasma comum (Nitzan *et al.*, 2002). Isolados vegetativamente compatíveis são considerados membros de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa, ou VCGs (“vegetative compatibility groups”) (Leslie, 1993). Neste caso, é esperada maior similaridade entre isolados de um VCG do que entre isolados de VCGs distintos. Isolados restritos a um VCG atuam como linhagens geneticamente isoladas que podem evoluir para características distintas de patogenicidade ou viabilidade vegetativa (Leslie, 1993). A constatação de grupos de compatibilidade vegetativa envolvendo isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pode ser útil para analisar a ocorrência de eventuais barreiras genéticas entre os isolados do patógeno e, conseqüentemente, contribuir para elucidar a estrutura genética da população do agente causal da ramulose.

Até o momento não existem estudos acerca da estrutura da população de Cgc. “Estrutura genética” refere-se à quantidade e à distribuição de variação genética dentro e entre populações (McDonald, 1997). Entende-se por população “um grupo de indivíduos que cruzam entre si e que co-existem no tempo e no espaço”. Novamente, a definição não se aplica totalmente a populações de fungos mitospóricos. Como até o momento, não se sabe se Cgc se reproduz sexuadamente, por processos parassexuais ou se existem grupos de compatibilidade vegetativa, utilizar-se-á a definição de população proposta por (McDonald, 1997): “um conjunto de indivíduos coexistindo no tempo e no espaço (em um mesmo campo) sujeitos às mesmas forças evolutivas”.

Para Cgc, a análise da estrutura genética da população do patógeno permite inferir sobre possível contribuição da reprodução sexuada, tipos e fontes de inóculo e suas implicações para epidemiologia da ramulose. Numa primeira etapa é necessário estudar os processos que levariam à reprodução sexuada do patógeno, tal como os de compatibilidade sexual e vegetativa. Posteriormente, deve-se avaliar se há ou não evidência de clonalidade da população. Para este propósito, o uso de marcadores moleculares é imprescindível.

Marcadores moleculares possuem a vantagem de ser seletivamente neutros e cobrirem boa parte do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por revelarem muitos locos é possível estimar com acurácia a frequência alélica e, em estudos de população, estabelecer a estrutura genética. Muitos estudos sobre população de patógenos já foram realizados utilizando-se marcadores do tipo AFLP (“Amplified fragment length polymorphism”) (Pongam et al., 1999, Vandemark, 1999, Tooley et al., 2002, Baayen et al., 2000). Marcadores AFLP são úteis para detectar seqüências de DNA polimórficas em fungos e possui vantagens quando comparada com outros marcadores: muitos locos são avaliados por vez em cada reação e primers de maior extensão são utilizados, o que assegura reprodutibilidade (McDonald 1997).

Estudos sobre a população de Cgc são, ainda, incipientes e, na maioria dos casos, poucos isolados foram utilizados e sempre coletados sem plano de amostragem que assegure a representatividade da população. O conhecimento da estrutura genética da população do patógeno poderá contribuir para entender melhor a epidemiologia da doença e explicar mudanças na reação de cultivares, viabilizando assim, o uso estratégico de variedades resistentes. O objetivo desse estudo foi elucidar a estrutura genética da população de Cgc com base em marcadores AFLP, grupos de compatibilidades sexual e vegetativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Plano de amostragem

A amostragem foi realizada de forma a possibilitar detecção de variações entre e dentro de populações do patógeno. Foram consideradas três subpopulações de isolados, coletados em regiões (Figura 1): *i*) antigas, abrangendo municípios com mais de 15 anos de cultivo de algodão (Santa Helena de Goiás (n = 24 isolados), Acreúna (n = 9), Itumbiara (n = 1) e Cachoeira Dourada (n = 1)); *ii*) intermediárias, onde o algodão é cultivado por mais de 8 anos e menos de 15 (Rondonópolis (n = 8), Primavera do Leste (n = 13) e Campo Verde (n = 21)) e *iii*) novas, com menos de 8 anos de cultivo (Itiquira (n = 14), Pedra Preta (n = 16), Alto Taquari (n = 6) e Novo São Joaquim (n = 4), Chapadão do Céu (n = 7), Montividiu (n = 6) e Mineiros (n = 3)). Em cada município,

foram amostrados até quatro focos da doença e, em cada foco, foram obtidas até seis amostras de folhas lesionadas em plantas com superbrotamento. Para se obter níveis hierárquicos de amostragem, em cada local amostrado, determinou-se a planta fonte (PF), a qual foi reconhecida por apresentar sintomas mais acentuados de superbrotamento. A partir da PF foram coletadas quatro amostras, uma em cada ponto cardeal e ainda uma amostra de cada planta adjacente na linha, o que totalizou seis amostras por foco. Os quatro focos amostrados em cada município distavam de, no mínimo, 100 m entre si. Utilizando-se GPS (sistema de posicionamento global), cada ponto coletado foi georeferenciado. As amostras foram identificadas e enviadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão para posterior isolamento. Foram coletados dados sobre severidade da doença no campo, controle químico utilizado, histórico da área, cultivar e idade das plantas.

Isolamento, cultivo *in vitro* e preservação.

De cada amostra, procedeu-se o isolamento indireto, em que fragmentos de tecidos contendo lesões previamente observadas sob microscópio estereoscópico, foram recortados e desinfestados por 30 s em hipoclorito de sódio (1,5%), imersos em etanol (70%) por 30 s e lavados em água destilada esterilizada (ADE) por três vezes. Os fragmentos foram depositados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de ácido láctico (1%). Colônias com crescimento e morfologia típicos de Cgc foram submetidas a dois subcultivos: o primeiro para tubos visando preservação e o segundo para os ensaios posteriores. A preservação foi realizada por desidratação de discos de micélio em tubos de vidro (10 mL) contendo sílica gel (Smith & Onions, 1983).

Determinação de grupos de compatibilidade sexual

Foram testadas as diferentes combinações de 17 isolados, cada um proveniente de diferentes municípios. Discos de micélio (0,7 mm de diâmetro) oriundos de colônias com idade entre 5 e 10 dias, de dois isolados, foram depositados em posições opostas

em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram mantidas em incubadora a 25° C com fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, as colônias foram observadas em lupa binocular, procurando-se pela presença de peritécios. Cada isolado foi pareado com os outros 16, totalizando 136 combinações. Cada combinação foi repetida duas vezes no tempo.

Grupos de compatibilidade vegetativa

Geração e caracterização de mutantes *Nit*.

Para o estudo de VCGs utilizaram-se isolados mutantes auxotróficos *Nit*, incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio. Os mutantes foram gerados utilizando-se técnicas já descritas (Korolev & Katan, 1997). Os isolados foram cultivados em meio Czapek Dox Ágar (CDA), com nitrato como única fonte de nitrogênio. Apenas os isolados que cresceram normalmente neste meio foram usados (n=76), pois converteram nitrato em amônia. Dez discos de micélio (2 mm), de cada isolado testado foram dispostos em placas de Petri (um disco por placa) contendo meio ágar-água-clorato - AAC (2% de ágar, 3% de clorato de potássio e 0,02% de glucose), que foram mantidas a 25° C, no escuro. Entre 7 e 21 dias de incubação, foram conduzidos testes de caracterização parcial dos mutantes selecionados. Discos de micélio da borda de setores em crescimento no meio AAC foram transferidos para placas de Petri contendo meio CDA ou CDA acrescido de hipoxantina 0,02 % (Korolev & Katan, 1997), as quais foram mantidas nas mesmas condições de incubação por 5 dias. A denominação dos fenótipos foi realizada conforme descrito por Brooker *et al.*, (1991) para *C. dematium*, seguindo a nomenclatura genética proposta por Yoder *et al.*, (1986). Colônias com crescimento micelial escasso em ambos os meios foram consideradas mutantes *NitM* e colônias com crescimento micelial escasso em CDA e com fenótipo “tipo selvagem” em CDA + hipoxantina foram consideradas *nit1/nit3*.

Três isolados de *C. gloeosporioides* oriundos de cebola, pimentão e manga e dois isolados da espécie *Cercospora coffeicola* também foram incluídos no estudo.

Testes de complementação.

Testes de complementação entre mutantes *Nit* foram conduzidos em placas de Petri contendo meio CDA. Previamente, 11 isolados de origens diversas foram pareados em todas as combinações possíveis, visando identificar possíveis grupos de compatibilidade, e assim usar um isolado representante de cada grupo detectado para os pareamentos posteriores. Apenas um grupo de compatibilidade foi detectado. Elegeram-

se dois mutantes do isolado Cgc193 (193c2 e 193c3, NitM e *nit1/nit3*, respectivamente) para os demais pareamentos. Cada pareamento envolveu um isolado caracterizado como NitM ou *nit1/nit3* e o mutante testador complementar (193c2 ou 193c3). Um disco de micélio (2 mm) de cada isolado (NitM ou *nit1/nit3*) foi colocado equidistante a 1 cm do testador. As placas foram mantidas a 25° C no escuro por 10 dias. A complementação foi visualizada por crescimento acentuado nas zonas de contato entre dois mutantes compatíveis.

Estudo de subpopulações com marcador AFLP

Obtenção do tecido para extração de DNA genômico.

Isolados de Cgc (n=144) foram cultivados, em meio BDA contido em placas de Petri a 25° C, com fotoperíodo de 12 h. Após 7 dias, foi coletado micélio aéreo do fungo com auxílio de um estilete flambado. Cerca de 50 mg de micélio foram transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e congelados imediatamente em N₂ líquido. O protocolo empregado para extração de DNA genômico foi o do CTAB (“cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide”) (Ferreira & Grattapaglia, 1998) com modificações. Após congelado, o tecido foi macerado dentro do tubo de microcentrífuga com o auxílio de um pistilo de vidro na presença de N₂ líquido. Após maceração, adicionaram-se 600 µL de tampão de extração com β-mercaptoetanol (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, CTAB 1% e β-mercaptoetanol 1%) e agitou-se o tubo em vórtex por 30 s. Em seguida, os tubos foram acondicionados em banho-maria a 65° C por 30 min, agitando-os a cada 5 min. Retiraram-se os tubos do banho-maria deixando-os esfriar em temperatura ambiente e, em seguida, adicionaram-se 600 µL de CIA (clorofórmio- álcool isoamílico, na proporção de 24:1, respectivamente), e os tubos foram agitados por inversão durante 5 min até obter uma emulsão homogênea. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 min a 4° C. Nesta extração, lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica inferior, enquanto DNA, RNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase aquosa superior. Após a centrifugação, transferiram-se as fases aquosa para novos tubos previamente marcados, adicionaram-se 60 µL de solução de precipitação (10% CTAB e 1,4 M NaCl), misturou-se por inversão durante 5 min e adicionaram-se 600 µL de isopropanol frio (-20° C). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 min a 4° C. O precipitado de DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%,

gelado, centrifugando a cada vez por 5 min. Lavou-se mais uma vez com 300 µL de etanol absoluto gelado, centrifugou-se por 5 min. e deixou-se secar ao ar por 15 min. sobre papel toalha. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (Tris-EDTA) e a seguir foi mantido por 30 min em temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas a -20° C.

A estimativa da concentração de DNA nas amostras foi feita em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, por meio de comparação com marcadores de concentrações conhecidas (25, 50 e 100 ng de DNA/µL).

Análises AFLP

As reações para análise de AFLP foram realizadas como o “AFLP Analysis System Kit for Microorganisms” (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD – Cat. 11352-010) de acordo com as instruções do fabricante (Vandemark, 1999). O DNA genômico (250 ng) foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI* a 37°C por 2 h e aquecido a 70°C por 15 min para inativar enzimas. Os fragmentos de DNA foram ligados a adaptadores *EcoRI* e *MseI* fornecidos pelo kit por 2 h a 20°C. Ao término da reação, a mistura de ligação foi diluída 10 vezes com água destilada esterilizada e os fragmentos foram pré-amplificados em 20 ciclos de PCR. A amplificação pré-seletiva seguiu o seguinte programa: 94°C por 30 s, 56°C por 60 s e 72°C por 60 s, como descrito (Vos *et al.*, 1995). Na amplificação seletiva, foram usados os primers já testados para *Colletotrichum* (O'Neill *et al.*, 1997). Nessa etapa, os ciclos foram: 94°C por 30 s, 56°C por 30 s e 72°C por 60 s, a partir do segundo ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida 0,7°C a cada ciclo por 12 ciclos, para permitir maior estrinência. O restante da reação (23 ciclos) foi de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s e 72°C por 60 s. O produto de PCR em subamostras de 2,5 µL foi separado por eletroforese, utilizando gel desnaturante de poliacrilamida 5% (peso/vol) contendo uréia 7,5 M.

Para visualização, utilizou-se a técnica descrita por Creste *et al.*, (2001), usando cuba de sequenciamento e coloração com nitrato de prata. As imagens dos géis foram capturadas e armazenadas. A presença ou ausência de todas as bandas entre 50 e 300 pares de bases (pb) foi registrada.

Quantificação da variabilidade genética

As subpopulações amostradas: áreas antigas (n=35 isolados), intermediárias (n=42 isolados) e novas (n=56 isolados) foram investigadas para se determinar a estrutura genética. Dados referentes aos marcadores moleculares (AFLP) foram utilizados para cálculos de diversidade genética. As bandas foram interpretadas como dois alelos (presença ou ausência) em um loco (Peever & Milgroom, 1994, McDonald, 1997). A diversidade genética de populações de Cgc foi estimada pelo índice de diversidade de Nei – H (Nei, 1973). A frequência de alelos para cada loco AFLP foi calculada para cada subpopulação e usada para estimar a medida de diversidade gênica de Nei (1973), a qual indica a probabilidade de dois isolados, escolhidos aleatoriamente em uma subpopulação, possuírem alelos diferentes. A diversidade genética máxima é 1, enquanto a mínima 0 (zero), indica uma população geneticamente uniforme, formada por uma linhagem clonal. Também foi calculada a estatística G_{st} de Wright, coeficiente que mede diferenciação genética ocasionada por subestruturação de populações, dada por $G_{st} = (H_t - H_s)/H_t$, em que H_s é a média da diversidade genética das sub-populações e H_t a estimativa da diversidade genética de toda população. As análises de H , G_{st} , identidade genética de Nei e a distância entre subpopulações foram realizadas com auxílio do programa TFPGA versão 1.3 (Miller, 1997). Com o mesmo programa, foi determinada a relação entre distância genética e distância geográfica pelo índice de Mantel, conforme outros trabalhos (Milgroom & Lipari, 1995a; b). Estimativas de fluxo gênico foram calculadas com base na estatística G_{st} . Calculou-se também o número médio de imigrantes (N_m) que deve ser trocado entre sub-populações a cada geração para manter o nível de similaridade genética observado.

Considerando o número e a distribuição (migração relativa) de cada fragmento de DNA (bandas), foi determinada a quantidade e a distribuição dos genótipos de Cgc (haplotipos). A partir da frequência dos haplotipos estimaram-se a diversidade genotípica em cada subpopulação (área de cultivo: velha, intermediária ou nova) usando a estatística G de Stoddart e Taylor (1988).

RESULTADOS

Compatibilidade sexual. Não foi observada formação de peritécios em nenhum pareamento, em ambas as repetições do ensaio. Devido a não formação da fase perfeita nos cruzamentos realizados e levando-se em consideração as diferentes origens dos

isolados, não se procurou estabelecer grupos de compatibilidade sexual para os demais isolados.

Grupos de compatibilidade vegetativa. Dois isolados, Cgc065 e Cgc066, não utilizaram nitrato como única fonte de nitrogênio. De todos os isolados testados, foi possível selecionar mutantes *nit*. A proporção de recuperação de mutantes *nit1/nit3* foi alta (83,7%) em detrimento à recuperação de mutantes NitM (7,4%). Do isolado Cgc059 não se recuperaram mutantes NitM.

Com o teste de complementação preliminar, envolvendo 11 isolados, não foi possível separar os isolados em diferentes grupos de compatibilidade, apesar da diferente origem geográfica desses isolados. O isolado Cgc093 fora escolhido para pareamentos com os demais mutantes gerados. Todos os pareamentos envolvendo os mutantes 093c3 (*nit1/nit3*) e 093c2 (NitM) com todos os demais mutantes, exceto o isolado Cgc159, resultaram em forte crescimento micelial na zona de contato entre as duas colônias (Figura 2). O isolado Cgc159 foi auto-pareado (dois mutantes: 159c3 e 159c8, *nit1/nit3* e NitM, respectivamente) e não houve crescimento “tipo selvagem” na área de contato das hifas.

Estrutura genética da população

Variação genética dentro de subpopulações. Nos isolados estudados, 34 locos AFLP foram identificados, considerando todas as bandas incluídas no intervalo entre os marcadores de 50 e 300 pb, independente da intensidade. Excluindo-se as bandas de intensidade fraca, foi possível analisar 23 bandas (locos). O tamanho da amostra (n), frequência alélica e medidas de diversidade gênica (H) para todas as subpopulações são apresentadas (Tabela 1). Os valores de diversidade gênica para as três subpopulações estudadas foram 0,065, 0,154 e 0,180, em áreas antigas, intermediárias e novas, respectivamente. O índice de diversidade gênica em toda a população, em todos os locos, variou de 0,015 a 0,448 (média de 0,147). Os valores de identidade genética de Nei foram altos e similares em todas as possíveis combinações envolvendo as três subpopulações: 0,9876 para a comparação antiga x intermediária, 0,9905 para antiga x nova e 0,9968 para a intermediária x nova.

A diversidade genotípica, analisada considerando os diferentes perfis de bandas AFLP como haplotipos, permitiu identificar 45 genótipos distribuídos nas três

subpopulações (Tabela 2). A frequência de genótipos variou conforme a idade de cultivo das áreas. Em áreas antigas (subpopulação 1) foram detectados nove genótipos diferentes com distribuição desigual. Na subpopulação 1, o haplotipo denominado “1” foi o de maior frequência (0,6). Nas áreas intermediárias (subpopulação 2) e novas (subpopulação 3) o número de genótipos foi maior, 23 e 25, respectivamente, e a distribuição foi mais uniforme. O haplotipo 1 também foi o mais freqüente nas subpopulações 2 e 3. Além do haplotipo 1, outros três (haplotipos “3”, “5” e “7”) ocorreram nas três subpopulações. Haplotipos raros e detectados em apenas uma subpopulação também ocorreram em números diferentes: 3, 16 e 18, nas subpopulações 1, 2 e 3, respectivamente. O índice genotípico de Stoddart e Taylor foi de 2,61, 11,31 e 7,61, respectivamente para as subpopulações 1, 2 e 3.

Variação genética entre populações. A fração da variação genética distribuída entre as subpopulações - G_{st} (Nei, 1973) foi em média 0,04. Apenas 4% da diversidade gênica foi distribuída entre as três subpopulações. A medida de identidade genética de Nei para os pares de subpopulações em todos os locos analisados, sugere baixa diferenciação entre as subpopulações (Tabela 1), confirmando a estatística G_{st} . A diversidade genética dentro de subpopulações, $H_s=0,133$, foi similar à diversidade genética total, $H_t=0,139$. O N_m médio foi estimado em 11,9 indivíduos entre as três subpopulações.

Não houve correlação ($r = -0,051$, $P=0,622$) entre a diversidade genética e distância geográfica, mensurada com o índice de Mantel (Figura 3).

DISCUSSÃO

Há evidências de que a estrutura genética da população de Cgc no Brasil seja clonal. Três fatos suportam esta afirmação: não detecção de reprodução sexuada, baixa diversidade gênica entre subpopulações e alta frequência de poucos haplotipos nas subpopulações amostradas.

Ao contrário do relatado para várias espécies de *Colletotrichum* (Edgerton, 1909; Bryson *et al.*, 1992; Vaillancourt *et al.*, 2000; Souza-Paccola *et al.*, 2003), Cgc não produziu peritécios *in vitro*. No entanto, há evidências de possibilidade de reprodução sexuada nessa espécie (Roca *et al.*, 2004). Parearam-se 4 isolados de *C. gossypii* e 12 isolados de Cgc em todas as combinações possíveis e um isolado de Cgc formou peritécios quando auto-pareado, sendo considerado portanto, homotático (Roca *et al.*, 2004). A não formação de peritécios nos pareamentos com dois isolados

diferentes também foi observada nesse estudo. Tal fato sugere que a ocorrência de reprodução sexuada seja pouco freqüente.

Em espécies do gênero *Colletotrichum*, a questão de homo ou heterotalismo não é bem definida. Em uma mesma espécie, podem ser observados isolados auto-férteis ou de fertilização cruzada. Isolados auto-férteis originam isolados auto-infertéis com alta freqüência (Vaillancourt & Hanau, 1991). Além disso, o gênero *Glomerella* têm múltiplas especificidades de compatibilidade sexual, ao contrário da maioria dos ascomicetos heterotáticos, em que a compatibilidade é geralmente controlada por um loco com dois alelos (Vaillancourt *et al.*, 2000, Wheeler, 1954). No presente estudo, o número de isolados pode ter sido insuficiente para se detectar, ou identificar, isolados sexualmente compatíveis, apesar de a origem dos isolados empregados ser diversa. Duas hipóteses podem ser levantadas para a não detecção da fase perfeita de Cgc. A primeira é que todos os isolados pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade sexual, e portanto, não são compatíveis entre si, assumindo-se heterotalismo completo. Outra possibilidade é que haja heterotalismo desbalanceado (Wheeler, 1954), e os isolados analisados não possuem alelos compatíveis, a exemplo do que ocorre com *C. graminicola* (Vaillancourt *et al.*, 2000). Experimentos mais detalhados ainda não foram conduzidos para testar esta segunda hipótese.

A freqüência de recuperação de mutantes *nit1/nit3* foi alta, à semelhança do observado em outros estudos que utilizaram mutantes auxotróficos na via de metabolismo do nitrato (Korolev & Katan, 1997). Embora a caracterização da mutação tenha sido parcial, é esperado que a maioria dos mutantes tenha sido *nit1*, conforme já determinado para outras espécies de *Colletotrichum* (Brooker *et al.*, 1991, Correll *et al.*, 1993, Nitzan *et al.*, 2002). Alguns mutantes não foram estáveis, e apresentaram setores “tipo selvagem” após algumas repicagens. Esse não é um fato raro, principalmente quando se trata de mutantes no gene estrutural da nitrito redutase (Várzea *et al.*, 2002).

Em pareamento com todas as combinações possíveis entre 11 isolados x duas mutações (*nit1/nit3* e NitM) todos os isolados formaram heterocáion viável entre si. Os testes foram conduzidos com dois mutantes do isolado (Cgc193) e em um total de 76 isolados. À exceção do isolado 159, todos formaram heterocáion na região de contato entre os dois mutantes. O isolado Cgc159 foi auto-pareado (dois mutantes: 159c3 e 159c8, *nit1/nit3* e NitM, respectivamente) e não houve crescimento “tipo selvagem” na área de contato das hifas. É possível que este isolado seja auto-incompatível.

Em alguns pareamentos, dependendo da combinação de mutantes empregados, a formação de heterocáion foi mais ou menos intensa. Todavia, em todas as

combinações de pareamentos, ao menos uma das duas combinações de mutantes, notavelmente quando se utilizava o mutante NitM do isolado testador, o heterocáion era mais forte. Como o mutante NitM pode ter sofrido mutação em um ou mais genes envolvidos na síntese ou montagem do cofator de molibdênio, alguns genes podem ter efeito mais deletério que outros no que tange à recuperação do “tipo selvagem” via anastomose e heterocariose.

É difícil inferir sobre a ocorrência de troca de material genético entre isolados de Cgc na natureza e até sobre o papel da compatibilidade vegetativa, dada a complexidade de fatores que podem interferir nesse processo em condições de campo. O fato de ser detectado apenas um grupo de compatibilidade vegetativa entre os isolados testados e que outras espécies foram incompatíveis (*C. gloeosporioides*) demonstra a baixa variabilidade dos isolados com relação a genes que controlam a incompatibilidade vegetativa. Os resultados aqui obtidos assemelham-se aos encontrados na África com a espécie *C. kahawe* em café, a qual também possui apenas um grupo de compatibilidade vegetativa (Várzea *et al.*, 2002).

Com base no marcador AFLP, há evidências de que a estrutura genética da população de Cgc estudada seja clonal. Houve alta homogeneidade de frequência alélica para a maioria dos locos analisados e, portanto, baixa diversidade gênica entre as três subpopulações. Quando se analisaram as frequências dos haplotipos, quatro, dentre os 45 observados, estavam presentes em todas as subpopulações. Um haplotipo esteve presente em alta frequência em todas as subpopulações amostradas. A prevalência de apenas um haplotipo nas três subpopulações suportam a hipótese de clonalidade. Entretanto, outros haplotipos também foram detectados, porém em menor frequência. Além disso, esses foram distribuídos de maneira agregada dentro do ponto de amostragem sempre que sua frequência foi maior que três haplotipos na subpopulação. Supostamente uma maior complexidade de haplotipos em áreas mais antigas de cultivo era esperada, porém o uso de poucas cultivares em anos anteriores nessa área pode ter limitado a migração de novos genótipos via sementes. Também, nessas áreas mais antigas, o plantio convencional (com revolvimento do solo) deve interferir na sobrevivência do patógeno, exercendo um efeito gargalo.

Por ser fungo de dispersão limitada, à exceção quando associado a sementes, pode-se inferir que o uso de sementes infestadas foi responsável tanto pela introdução do patógeno em novas áreas, bem como pela redistribuição em áreas antigas. Apesar de não se conhecer se há equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética, condições necessárias para inferir sobre número de migrantes (Milgroom e Lipari, 1995), este foi

estimado e o valor obtido é relativamente alto, cerca de 12 indivíduos por geração. Essa estimativa não reflete o número exato de migrantes por geração, mas sugere haver intenso fluxo gênico entre as subpopulações. Não havendo limitação do movimento de genes entre subpopulações, não é esperado haver correlação entre distância genética e distância geográfica. De fato, não houve correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos isolados, reforçando que o fluxo do patógeno via sementes ocorre e que o mesmo clone pode ser encontrado em várias regiões. Do ponto de vista aplicado, medidas para limitar a movimentação ou a introdução de sementes contaminadas devem ser mais rigorosas.

A alta frequência de um haplotipo é indicativo de estrutura clonal, mas também pode ser causada por artefato relacionado à capacidade de detecção de polimorfismos do marcador utilizado. O marcador AFLP é capaz de cobrir grande parte do genoma, porém, é possível que a maioria das bandas criadas a partir de sítios de restrição estejam localizadas em regiões conservadas do genoma, ou ainda, considerando haver suficiente variação no genoma do organismo, que nos fragmentos amplificados não houve variação interna (deleções ou adições). De outra forma, o baixo polimorfismo detectado pode refletir a dominância de poucos genótipos na população considerando que o esquema de amostragem adotado é capaz de detectar variações na população. A detecção de outros haplotipos no entanto assegura que o marcador utilizado neste estudo foi capaz de detectar polimorfismos e que a alta frequência de um haplotipo pode ser considerada evidência de clonalidade da população. De maneira geral, pode-se inferir que a população de Cgc estudada tem estrutura clonal, com ausência de grupos de compatibilidade vegetativa e sem aparente reprodução sexuada. Ocorre grande fluxo gênico e sementes infectadas desempenham importante papel na dispersão, principalmente para áreas novas. Nesse contexto, implementação de táticas de manejo que visem impedir ou dirimir o fluxo de sementes infectadas, bem como reduzir o inóculo inicial em áreas onde o patógeno já ocorre serão necessárias. Devido ao modo de dispersão do patógeno, associado à baixa diversidade genética. Futuros trabalhos envolvendo um número maior de isolados e com amostragens em épocas (safras) diferentes poderão elucidar a ocorrência de mudanças na população do patógeno ao longo do tempo.

Os autores agradecem ao Fundo de Amparo à Cultura do Algodão – FACUAL, pelo financiamento parcial do trabalho.

Figura 1. Regiões produtoras de algodão amostradas (detalhes no texto).

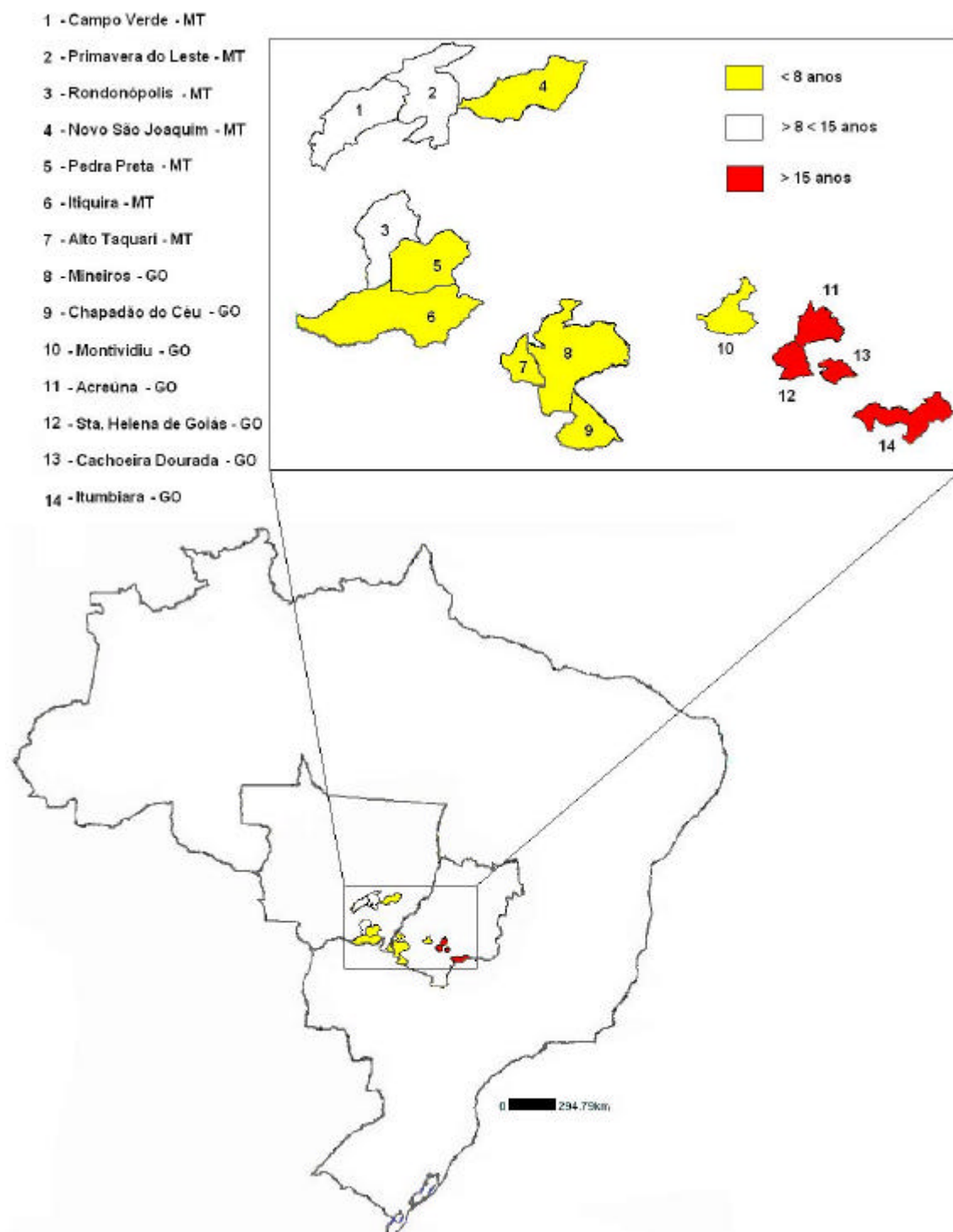


Figura 2. Reação compatível entre isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa, envolvendo dois mutantes auxotróficos na rota de assimilação de nitrato. O disco de micélio da direita é o isolado testador (mutante 193c2, Nit M), pareado com outro isolado *nit1/nit3*.

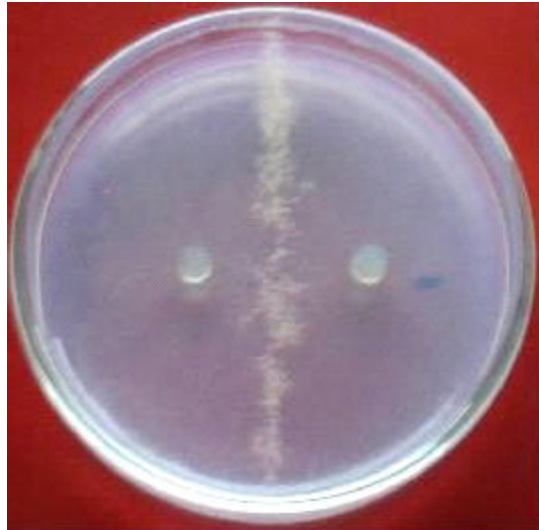


Tabela 1. Frequência alélica de 23 locos AFLP em três subpopulações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Subpop ¹	Loco AFLP																							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
V (n=35)	1,000	1,000	0,943	1,00 0	0,943	1,00 0	1,00 0	0,14 3	0,97 1	0,97 1	0,97 1	1,00 0	0,77 1	1,00 0	1,00 0	1,000	0,91 4	1,00 0	0,88 6	1,00 0	1,00 0	0,91 4	1,00 0	0,
I (n=42)	0,857	0,881	0,571	0,97 6	0,714	0,97 6	1,00 0	0,11 9	0,88 1	0,88 1	0,92 9	1,00 0	0,66 7	0,92 9	0,97 6	1,000	0,81 0	1,00 0	0,95 2	0,97 6	0,97 6	0,88 1	1,00 0	0,
N (n=56)	0,875	0,875	0,768	0,92 9	0,714	0,98 2	0,98 2	0,10 7	0,85 7	0,89 3	0,92 9	0,96 4	0,58 9	0,91 1	0,94 6	0,929	0,75 0	0,98 2	0,94 6	0,94 6	0,92 9	0,87 5	0,96 4	0,
																								M
T (n=133)	0,902	0,910	0,752	0,96 2	0,774	0,98 5	0,99 3	0,12 0	0,89 5	0,91 0	0,94 0	0,98 5	0,66 2	0,94 0	0,97 0	0,970	0,81 2	0,99 3	0,93 2	0,97 0	0,96 2	0,88 7	0,98 5	
H	0,176	0,164	0,373	0,07 2	0,349	0,03 0	0,01 5	0,21 2	0,18 8	0,16 4	0,11 3	0,03 0	0,44 8	0,11 3	0,05 8	0,058	0,30 5	0,01 5	0,12 6	0,05 8	0,07 2	0,20 0	0,03 0	0,
G ²	8,498 *	7,754 *	15,645* *	4,34 8	9,414* *	1,27 5	1,74 0	0,25 5	3,83 1	2,73 4	0,96 7	3,50 2	3,29 0	5,17 0	3,06 3	7,091 *	4,19 1	1,74 0	1,49 8	3,06 3	4,34 8	0,37 4	3,50 2	
H _s	0,155	0,143	0,318	0,06 0	0,308	0,02 7	0,01 2	0,21 5	0,17 0	0,15 2	0,10 7	0,02 3	0,42 7	0,09 8	0,04 9	0,044	0,28 0	0,01 2	0,13 2	0,04 9	0,06 0	0,19 5	0,02 3	0,
H _t	0,163	0,150	0,364	0,06 2	0,331	0,02 7	0,01 2	0,21 6	0,17 5	0,15 5	0,10 8	0,02 4	0,43 8	0,10 1	0,05 0	0,047	0,28 9	0,01 2	0,13 3	0,05 0	0,06 2	0,19 6	0,02 4	0,
G _{st}	0,050	0,044	0,127	0,02 9	0,070	0,00 8	0,01 2	0,00 2	0,02 8	0,02 1	0,00 8	0,02 4	0,02 5	0,02 9	0,01 9	0,049	0,03 2	0,01 2	0,01 4	0,01 9	0,02 9	0,00 3	0,02 4	0,
Nm	9,57	10,77	3,45	16,9 3	6,63	66,4 0	41,2 5	244, 2	17,5 4	23,6 2	65,5 0	20,2 5	19,1 6	16,5 4	25,6 6	9,75	15,1 8	41,2 5	36,2 4	25,6 6	16,9 3	163, 2	20,2 5	1

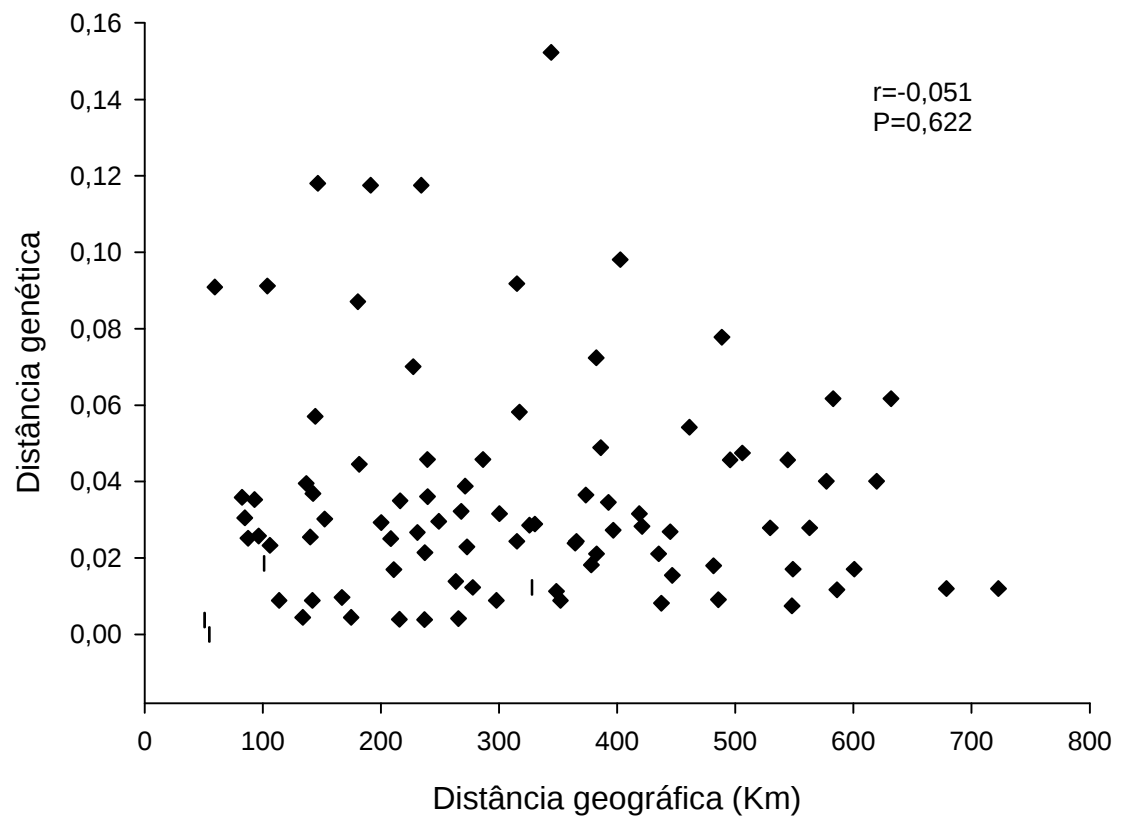
1=V: Isolados coletados em áreas com mais de 15 anos de cultivo de algodão; I: Áreas entre 8 e 15 anos de cultivo e N: Áreas com menos de 8 anos de cultivo; T=população total; H=Diversidade gênica de Nei (1973); G²=Teste de X². Hipótese de nulidade de não haver diferença na frequência alélica entre subpopulações (* indica P<0,05; ** P<0,01); H_s=Diversidade genética dentro de subpopulações; H_t=Diversidade genética total; G_{st}=Diversidade genética entre subpopulações, como uma proporção da diversidade total G_{st}=(H_t-H_s)/H_t (Nei, 1973).

Tabela 2. Frequência de haplotipos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* construídos a partir de análise multiloco de marcadores AFLP em três subpopulações: 1- mais de 15 anos de cultivo; 2- entre 8 e 15 anos e 3- menos de 8 anos.

	Genótipo AFLP ^a	Subpop. 1	Subpop. 2	Subpop. 3
1	111111101111111111111111111111	0,600	0,238	0,321
2	111111101111101111111011101	0,029		
3	111111101111101111111111111111	0,057	0,048	0,089
4	1101011111111011111111111101	0,029		
5	111111101111111111111011111111	0,086	0,024	0,018
6	110111111111101111111111111111	0,029	0,024	
7	111111111111111111111111111111	0,057	0,048	0,036
8	111101101001111110111111111111	0,057		
9	111111101111101111011111111111	0,057		0,036
10	000101101111111110111111111111		0,024	
11	000101101011110111111111111111		0,024	
12	110111101111111111111111111111		0,071	
13	111111101111111111101111111111		0,071	
14	00000010001100011100001		0,024	
15	111101100001111110111111111111		0,024	
16	110111101101111111111111111111		0,024	
17	1111111011111011111111111101		0,048	
18	1111011011111011111111111101		0,024	
19	110111101111101111111111111111		0,048	
20	110111111111111111111111111111		0,048	
21	110101100111011101111111111111		0,024	
22	110111101111101111011111111111		0,024	0,054
23	000101100001101101111111111111		0,024	
24	1101011011111011111111111101		0,024	
25	111101101111101111111111111111		0,048	0,036
26	000101100011111111111111111111		0,024	
27	010101101111111111111111111111		0,024	
28	111111111111101111111111111111			0,054
29	000101101111111110111111111111			0,018
30	000111101111101111101111111111			0,018
31	11111110011111111101111011			0,018
32	1111111011111111111101101			0,018
33	110111101101111110111111111111			0,018
34	110101110111011111101101			0,018
35	110111101101111100111111111111			0,018
36	1111111011111011101111101			0,018
37	000101101111101111111111111111			0,018
38	000000000000011110110111111111			0,018
39	111101101111111111111111111111			0,071
40	000001100011000111111001			0,018
41	001001100011001111111111111111			0,018
42	111101101111100000010000			0,018
43	110101100001111100110111111111			0,018
44	1101011000110011111111100			0,018
45	001001100010100101111001			0,018
N ^b		9	23	25
G ^c (Stoddart e Taylor)		2,612	11,308	7,612

A= Haplotipos (genótipos multilocos): 1 representa presença e 0 ausência de alelos em 23 locos analisados; B = Número de genótipos multilocos; C = Diversidade genotípica.

Figura 3. Relação entre distância genética (Nei, 1973) e distância geográfica de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Araújo, A. E. Doenças da cultura do algodoeiro no cerrado. CONGRESSO INTERNACIONAL DO AGRONEGÓCIO DO ALGODÃO, Cuiabá-MT. 2000.
- Atkinson, G. F. Anthracnose of cotton. *Journal of Mycology* 6: 173-178. 1891.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A. & Waalwijk, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891-900. 2000.
- Brooker, N. L., Leslie, J. F. & Dickman, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81: 672-677. 1991.
- Bryson, R. J., Caten, C. E., Hollomon, D. W. & Bailey, J. A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: J. A. Bailey and M. J. Jeger (Ed.) *Colletotrichum* - Biology, pathology and control. Wallingford. CAB International. 1992. pp. 1-26.
- Correll, J. C., Guerber, J. C., Wasilwa, L. A., Sherrill, J. F. & Morelock, T. E. Inter- and intra-species variation in *Colletotrichum* and mechanisms which affect population structure. In: D. Prusky, S. Freeman and M. B. Dickman (Ed.) *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St. Paul. The American Phytopathological Society. 2000. pp. 45-56.
- Correll, J. C., Morelock, T. E. & Guerber, J. C. Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium*. *Plant Disease* 77: 688-691. 1993.
- Costa, A. S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Jornal de Agronomia* 2: 265-272. 1939.
- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. *Revista de Agricultura* 12: 249-259. 1937.
- Creste, S., Tulmann-Neto, A. & Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Report* 19: 299-306. 2001.
- Edgerton, C. W. The perfect stage of the cotton anthracnose. *Mycologia* 1: 115-121. 1909.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3a ed. Brasília. EMBRAPA. 1998.
- Korolev, N. & Katan, T. Improved medium for selecting nitrate non-utilizing (nit) mutants of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 87: 1067-1070. 1997.

- Leslie, J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127-150. 1993.
- Lima, E. F., Batista, F. A. S. & Vieira, R. M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle. In: N. E. M. Beltrão (Ed.) *O Agronegócio do Algodão no Brasil*. Brasília. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 1999. pp. 717-752.
- Lima, E. F. & Chaves, G. M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 17: 61-66. 1992.
- McDonald, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453. 1997a.
- Milgroom, M. G. & Lipari, S. E. Spatial analysis of nuclear and mitochondrial RFLP genotypes in populations of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology* 4: 633-642. 1995a.
- Milgroom, M. G. & Lipari, S. E. Spatial analysis of nuclear and mitochondrial RFLP genotypes in populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology* 4: 633-642. 1995b.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Miranda, J. E. & Suassuna, N. S. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Embrapa Algodão: Circular Técnica 76 48. 2004.
- Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 70: 3321-3323. 1973.
- Nitzan, N., Hazanovsky, M., Tal, M. & Tsrer (Lahkim), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. *Phytopathology* 92: 827-832. 2002.
- O'Neill, N. R., van Berkum, P., Lin, J. J., Kuo, J., Ude, G. N., Kenworthy, W. & Saunders, J. A. Application of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* Pathogens of Alfalfa. *Phytopathology* 87: 745-750. 1997.
- Peever, T. L. & Milgroom, M. G. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84: 515-519. 1994.
- Pizzinatto, M. A. & Tanaka, M. A. S. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. II. Avaliação em casa de vegetação. *Summa Phytopathologica* 22: 122-127. 1996.

- Pongam, P., Osborn, T. C. & Williams, P. H. Assessment of genetic variation among *Leptosphaeria maculans* isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease* 83: 149-154. 1999.
- Roca, M. M. G., Machado, J. C., Vieira, M. G. G. C., Davide, L. C. & Rocha, M. L. M. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. *Fitopatologia Brasileira* 29: 16-20. 2004.
- Smith, D. & Onions, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 1983.
- Souza-Paccola, E. A., Fávaro, L. C. L., Casela, C. R. & Paccola-Meirelles, L. D. Genetic recombination in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Phytopathology* 151: 329-334. 2003.
- Stoddart, J. A. & Taylor, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705-711. 1988.
- Tanaka, M. A. S., Menten, J. O. M. & Machado, J. C. Hábito de crescimento de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro. *Bragantia* 55: 95-104. 1996a.
- Tanaka, M. A. S., Pizzinatto, M. A. & Soave, J. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. I. Avaliação em laboratório. *Summa Phytopathologica* 22: 116-122. 1996b.
- Tooley, P. W., Goley, E. D., Carras, M. M. & O'Neill, N. R. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from the United States, Mexico, Africa, Australia, India, and Japan. *Plant Disease* 86: 1247-1252. 2002.
- Vaillancourt, L. J. & Hanau, R. M. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Phytopathology* 81: 530-534. 1991.
- Vaillancourt, L. J., Wang, J. & Hanau, R. M. Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola*. In: D. Prusky, S. Freeman and M. B. Dickman (Ed.) *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul. The American Phytopathological Society. 2000. pp. 29-44.
- Vandemark, G. J. Detection of Polymorphisms in Fungi Using the AFLP Technique and Agarose Gels. *Focus* 21: 26. 1999.
- Várzea, V. M. P., Rodrigues Jr., C. J. & Lewis, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawe* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology* 51: 202-207. 2002.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414. 1995.

- Wheeler, H. E. Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. *Phytopathology* 44: 342-345. 1954.
- Yoder, O. C., Valente, B. & Chumley, F. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76: 383-385. 1986.

**Sensitivity of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* to Carbendazim,
Tebuconazole, and Azoxystrobin Under Laboratory Conditions and Chemical
Control of Cotton Ramulose Under Field Conditions.**

**Nelson D. Suassuna^{1*}, Joel A. Queiroz¹, Aldenise B. de Oliveira¹, Luiz A. Maffia²,
Eduardo S. G. Mizubuti²**

¹Embrapa Algodão. Rua Osvaldo Cruz 1143 Centenário – CP 174 CEP 58107-720
[Campina Grande](mailto:suassuna@cnpa.embrapa.br) – PB, e-mail: suassuna@cnpa.embrapa.br; ²Departamento de
Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa – MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Nelson D. Suassuna

SUASSUNA, N. D., QUEIROZ, J. A., OLIVEIRA, A. B., MAFFIA, L. A. & MIZUBUTI, E. S. G. Sensitivity of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* to carbendazim, tebuconazole, and azoxystrobin under laboratory conditions and chemical control of cotton ramulose under field conditions. Fitopatologia Brasileira.

ABSTRACT

Cotton “ramulose”, caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), reduces fiber yield and increases production costs of cotton in Brazil. Due to the lack of resistant cotton varieties with suitable agronomic traits, fungicide application either associated or not with cultural methods, is an effective control measure commonly adopted by growers. Frequent sprays of protectant and systemic fungicides are routinely used, but reduced efficacy of chemicals has been noticed. Thus, sensitivity of Cgc isolates to carbendazim, tebuconazole, and azoxystrobin was assessed. Baseline population sensitivity was established with isolates collected where no fungicide was used. For *in vitro* assays, the ED₅₀ values of carbendazim (n=88 isolates) ranged from 0.037 to 1.474 µg a.i./mL, a 40-fold sensitivity factor. No resistance to carbendazim (ED₅₀ > 10 µg a.i./mL) was detected. Similarly, ED₅₀ values for tebuconazole (n=91) and azoxystrobin (n=82) were low and ranged from 0.020 to 0.191 and from 0.019 to 0.068 µg a.i./mL, respectively. In a field assay, disease progress was followed on the susceptible cultivar BRS Ipê. Plots artificially inoculated were treated twice with fungicides in several combinations. Fungicides were not highly effective in controlling ramulose, although differences (P=0.007) in area under the disease progress curve among treatments were detected. The most effective treatment was an application of trifloxystrobin + propiconazole (62.5 + 62.5 g. a. i. /ha) at 44 days after inoculation

(DAI) and a second application of carbendazim + fentin hydroxide (250 + 250 g. a. i./ha) 64 DAI. Lack of disease control was attributed to heavy rain during the season as well as a delay in the first fungicide application. Disease management involving fungicide application is discussed.

INTRODUCTION

In the past few years, Brazil has become a major cotton fiber producing and exporting country in South America (Kist *et al.*, 2004), mostly because the increase in acreage that occurred in the savannah region of west-central Brazil. In this region, the hot and wet weather that prevails during the cotton growing season (November to July) is highly favorable to several foliar diseases. “Ramulose” (“escobilla” in Spanish or “witches’ broom”, in English), firstly reported in Brazil in 1937 (Costa & Fraga Jr., 1937), is an important fungal disease during the growing season and is apparently confined to South America. Ramulose is caused by a distinct physiological variety of *C. gossypii*, named *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), although no authoritative description of the morphology of this pathogen has been reported (Costa & Fraga Jr., 1939). Cotton plants can be infected at all developmental stages, and disease symptoms comprise shortening of internodes and excessive development of branches and leaves, causing witches’ broom type of symptom (Miranda & Suassuna, 2004, Thaxton & El-Zik, 2001).

Currently, management of ramulose is based on crop rotation to reduce initial inoculum, use of cultivars with some level of resistance, and fungicide sprays (Miranda & Suassuna, 2004). Nevertheless, these practices are not always integrated, and application of fungicides is the only control measure adopted. Among the fungicides, site-specific compounds are commonly used either solely or combined. It is well known that frequent sprays of the same active ingredients favours selection of fungicide resistant isolates. Although there are no reports of insensitive populations of Cgc in Brazil, growers frequently complain about the lack or reduced efficacy of fungicides after spraying crops for ramulose and areolate mildew, caused by *Ramularia areola*.

Because of their specific, single-site, mode of action, the systemic and translaminar fungicides are generally more at-risk for resistance development than contact fungicides (McGrath, 2001). Among the systemic fungicides, the benzimidazoles, triazoles, and strobilurins (quinone outside inhibitors - QoI) have been commonly used to manage ramulose in Brazil. Fungicides are usually applied when the

first lesions appear on young leaves before the apical meristem is damaged. Where crop rotation is performed, ramulose is not noticed or sometimes disease symptoms appear at the end of the season (“late ramulose”). However, where cotton is continuously cultivated (e.g. in areas without crop rotation), fungicides are sprayed as early as 30 days after plant emergency. Aerial applications are routinely employed and sometimes exceed two sprays per season, particularly in rainy years.

Resistance of plant pathogenic fungi to benzimidazoles, triazoles, and strobilurins fungicides is commonly reported (Brent & Hollomon, 1998, Gisi *et al.*, 2000, Hsiang *et al.*, 1997, LaMondia & Douglas, 1997, Chin *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2001, McGrath, 2001, Avila-Adame *et al.*, 2003, Cunha & Rizzo, 2003, Kim *et al.*, 2003, Pasche *et al.*, 2004, Yoshimura *et al.*, 2004). Given the frequent usage of these fungicides in cotton crops and the high genetic variability of Cgc (Lima & Chaves, 1992), the reduced efficacy of fungicides in controlling ramulose could be associated with insensitive pathogen populations. Thus, we tested the hypothesis of occurrence of insensitive isolates of Cgc to the most commonly used systemic fungicides in the major Brazilian cotton growing areas. Our approach was to sample isolates from several fields where systemic fungicides were used; estimate the effective dosage to inhibit fungal growth by 50% (ED₅₀); and compare these ED₅₀ values to ED₅₀ values estimated with isolates from fields with no fungicide application – baseline population. We also assessed the effect of systemic fungicides on ramulose progress in the field.

MATERIALS AND METHODS

Fungicide resistance assays

Compounds. Commercial formulations of azoxystrobin, tebuconazole, and carbendazim were used in all experiments.

Sampling, isolation, and maintenance of isolates. Isolates were sampled from cotton growing areas in counties across the west-central region of Brazil (Figure 1). Isolates from areas with no reports of fungicide usage in cotton plants (Campina Grande, Paraíba State, and Viçosa, Minas Gerais State) were considered to form the baseline population whereas the other isolates were considered non-baseline. In each county, one to four areas (georeferenced with a portable global positioning system device and distant at least 100m from each other) were sampled, depending on disease occurrence and intensity. In each area, one to six diseased leaves from plants with

typical ramulose symptoms were sampled. From each sample, to indirectly isolate the pathogen, leaf fragments with ramulose lesions were surface sterilized for 60s with sodium hypochlorite (NaClO 1.5 %), rinsed once in sterilized distilled water (SDW), immersed in alcohol (70%) for 30s, and washed again in SDW. The fragments, each with a single lesion, were placed on sterile filter paper to remove water excess and transferred to potato dextrose agar medium (PDA) with lactic acid (1%) on Petri dishes (9-cm-diameter). One isolate was obtained directly from a conidium at the top of setae in an old lesion. The Petri dishes were sealed and maintained at 25° C, 12 h day length. After 3 to 5 days, hyphal tips were cut from each colony and transferred to other PDA plates. To confirm each colony as of *Cgc*, microscopical observations of conidia were performed. Five 7-mm diameter mycelial disks were transferred to vials (6 cm) with silica gel for long term preservation as described by Smith and Onions (1983). For each experiment, an isolate was subcultured through five transfers, at the most. Three (for carbendazim and azoxystrobin tests) or two (for tebuconazole tests) isolates of *C. gloeosporioides* from mango, apple, or pepper were included to compare fungicide sensitivity. In the tebuconazole assays, three spontaneous carbendazim resistant strains found on PDA amended with 1000 µg carbendazim/mL were also included, to test for cross-resistance to tebuconazole.

***In vitro* tests.** Sensitivity of 82, 91, or 88 *Cgc* isolates to azoxystrobin, tebuconazole, or carbendazim, respectively, was estimated based on colony growth inhibition. Azoxystrobin and tebuconazole were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and carbendazim on 100% ethanol, to obtain stock solutions at 1000 µg a.i. of either azoxystrobin or tebuconazole/mL, or 10000 µg a.i. carbendazim/mL. The stock solutions were added to PDA medium after sterilization to produce final concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 µg a.i. of azoxystrobin or tebuconazole/mL, or 0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg a.i. of carbendazim/mL.

For each isolate, a 9-mm diameter mycelial plug cut from the edge of a colony grown on PDA was placed in the center of dishes with PDA, amended with each fungicide concentration. The plates were kept at 25° C, in the dark. After 6 days, colony diameter was measured in two perpendicular directions, and the diameter of the mycelial plug was subtracted to calculate the mean diameter of the colony (MD).

For each concentration/fungicide, inhibition of colony growth (ICG) of an isolate *i* was calculated by $ICG_i = (MD_c - MD_i / MD_c) \times 100$, in which MD_c = colony mean diameter for the control (no fungicide amended), and MD_i = colony mean

diameter for isolate *i*. For each replicate of each isolate-fungicide concentration combination, values of ICG_i were linearly regressed on the logarithm ($\log_{10}$) of fungicide concentration to estimate the dose that inhibited mycelial growth by 50% (ED_{50} values). The whole range of ED_{50} values for each fungicide was divided at constant intervals (0.01, 0.04, and 0.005 $\mu\text{g/mL}$, for tebuconazole, carbendazim, and azoxystrobin, respectively) for each population (baseline and nonbaseline). The frequency of isolates in each ED_{50} intervals for each fungicide was determined. For each fungicide, comparisons were conducted with the NPAR1WAY procedure by using the Kolmogorov-Smirnov test to determine significant differences in distribution of ED_{50} values between baseline and non baseline. The experiment was conducted once. All statistical analyses were performed using SAS version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC).

Effect of systemic fungicides on ramulose progress under field conditions.

This experiment was conducted at the Embrapa experimental area in Santa Helena de Goiás, Goiás State, in west-central Brazil. Seeds of cultivar BRS Ipê, susceptible to ramulose, were sowed on 24 November 2003. Rows were spaced by 0.9 m, and plant density in each row was adjusted to 7 plants/m after rough-hewing.

Six isolates of Cgc, sampled from different cotton producing areas in Brazil (Table 1), were grown in PDA medium in Petri dishes. After 10 days growing at 25° C and 12 h day length, 10 mL of SDW were added to each plate, the colonies were washed gently, and suspensions (5×10^4 to 1×10^5 conidia/mL) were prepared to inoculate cotton plants in the field. Plants in the vegetative stage B₂ to B₄ (floral buds on the second to fourth fruiting branch) were inoculated in 5 January 2004, by spraying conidia suspension in the whole plants until runoff.

Twelve treatments were evaluated (Table 2). The choice of fungicide treatments was based on license usage in cotton (treatments 3 and 5), chemical companies “packages” for cotton that included two fungicides with different modes of action (treatments 4, 6, 7, 8, 9, and 10), and low cost products (the remaining treatments). In all treatments, but treatment 11, the active ingredient was changed in the second spray. In an adjacent area, two non-inoculated plots were established. In one of them, fungicides were sprayed as described for treatment 7, whereas in the other plot no fungicide was sprayed.

Fungicide sprays started when initial symptoms of over sprouting (grade 3 in Table 3) were noticed in the field. Fungicides were sprayed twice, on 18 February and 9 March 2004, corresponding to 44 and 64 days after inoculation (DAI), respectively

(Table 2). Fungicides were sprayed using a CO₂-powered backpack sprayer at 300 kPa, approximately 200 L/ha with a flat fan-type nozzle (SS DG 11002).

Each experimental unit was manually harvested, and cotton yield was computed by weighing mature bolls of all plants from the two central rows in a plot. Yield values were estimated for one hectare (Kg/ha).

The experimental design was randomized complete blocks with five replicates, and each experimental unit included five rows each of 5 m. Ramulose intensity was assessed in 20 plants of the two central rows of an experimental unit. Ramulose severity was assessed four times with a rating scale (Araújo & Suassuna, 2003) (Table 3) and from the notes attributed to each plant, an infection intensity index (I) was calculated, in which $I = \sin^2 \omega$, for each frequency distribution from each plot (Amaral, 1969). Its angular transformation ($w = \arcsin \sqrt{I}$) permits the analysis of variance (Czermainski, 1999). The ω variable was calculated to convert notes (grades) to interval scales. Disease progress curves were plotted and the area under the disease progress curve (AUDPC) was determined (Fry, 1977). Values of ω , AUDPC, and yield were submitted to ANOVA and the means subjected to multiple comparisons procedures. Pearson correlation between yield and AUDPC and ω were performed. All data were analyzed with the SAS v. 8 program.

RESULTS

Sensitivity to tebuconazole, carbendazim, and azoxystrobin

The ED₅₀ values for tebuconazole ranged from 0.020 to 0.191 µg/mL and no insensitive isolate was detected (Figure 2). Baseline and nonbaseline isolates were equally sensitive to tebuconazole, although the range of sensitivity of baseline isolates was narrower (from 0.041 to 0.095 µg/mL) than of nonbaseline isolates (0.020 to 0.191). There was no difference (P=0.270) between the distribution of ED₅₀ values of the baseline and nonbaseline populations. The ED₅₀ of the two *C. gloeosporioides* and three *C. gossypii* var. *cephalosporioides* isolates considered spontaneous mutants resistant to carbendazim also fell in the same range of sensitivity of the nonbaseline population.

The ED₅₀ values for carbendazim ranged from 0.037 to 1.470 µg/mL among the non baseline isolates (Figure 3), while ED₅₀ values for baseline isolates ranged from

0.270 to 1.248 µg/mL. Frequency distributions of ED₅₀ values of baseline population differed (P=0.001) from ED₅₀ values of nonbaseline population. A sensitivity factor, calculated as the highest ED₅₀ value/the lowest ED₅₀ value, was approximately 40-fold, indicating great variation between samples. Nevertheless, the maximum ED₅₀ value was less than 2 µg/mL, which is considered sensitive. ED₅₀ values for the three *C. gloeosporioides* isolates from mango, pepper, and apple were 0.259, 0.698, and 2.702 µg/mL, respectively.

The range of ED₅₀ values for azoxystrobin varied from 0.019 to 0.068 µg/mL. The sensitivity factor was 3.5 fold. The ED₅₀ values for the baseline population ranged from 0.029 to 0.063 µg/mL (Figure 4). There was no difference between sampled and baseline populations (P=0.576). ED₅₀ values of the three *C. gloeosporioides* isolates were 0.539, 0.519, and 0.046 µg/mL. For one isolate of *C. gloeosporioides* (ED₅₀ = 0.539) there was a 27 fold sensitivity factor in relation to the smallest ED₅₀ value of *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Effect of systemic fungicides on ramulose progress under field conditions

Severity was firstly assessed at the inoculation day and no ramulose symptoms were found. The second assessment was on 26 January 2004, 21 DAI, and few plants (maximum four) in each plot had initial symptoms of over sprouting (grade 3). The third assessment was on 17 February 2004, 43 DAI, and most plants (at least 12 out of 20) were rated 3 and 4. The next day, fungicides were firstly sprayed. After 20 days, 64 DAI, fungicide was sprayed the second time. Ramulose severity was assessed on the next day, 65 DAI, and the highest severity value was 71.99 on the control plot.

Disease progress curves of all treatments were similar in the first three assessments (Figure 5). Treatments differed regarding Amaral's disease index estimated for the last severity assessment (P< 0.0001), AUDPC (P=0.007), and yield (P= 0.044). Yield was negatively correlated with AUDPC (r=0.725, P=0.008) and DI (r=0.695, P=0.012).

DISCUSSION

There was no evidence of insensitivity of Brazilian isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* to any of the tested fungicides. The ED₅₀ range for tebuconazole estimated in the present study is higher than values previously reported for other ascomycetes such as *Monilinia fructicola* in which $0.001 < \text{ED}_{50} < 0.063$ (Yoshimura *et al.*, 2004) and *Sclerotinia homoeocarpa*, in which $0.002 < \text{ED}_{50} < 0.094$ (Hsiang *et al.*, 1997). The values we estimated for tebuconazole are in the range reported for sensitive populations of *Mycosphaerella graminicola*, in which $0.01 < \text{ED}_{50} < 0.90$ (Gisi *et al.*, 1997). The ED₅₀ sensitivity factor (relation between the most and the least sensitive isolates in a population) for Cgc varied by 10 fold. This variation is relatively low compared with cyproconazole data from *M. graminicola* in Europe for which ED₅₀ varied from 7 to 40 fold (Gisi *et al.*, 2000). As the mode of action of DMIs involves several pathways (Gisi *et al.*, 2000) and, as for many plant pathogens, sensitivity seems to be rather stable, we would expected a long time of reliable disease control if anti-resistance strategies are deployed, including the use of mixtures and alternation of products from different classes.

We found no differences between ED₅₀ of isolates of the baseline and nonbaseline populations and there is no evidence of cross resistance between tebuconazole and carbendazim. Knowledge of whether or not a fungicide can control strains of the target pathogen that are known to be resistant to other fungicides is a key component of resistance risk assessment. In this study, spontaneous carbendazim resistant strains, selected on high concentration media amended with the fungicide, were not able to grow in medium amended with tebuconazole. In severe outbreaks of either ramulose or areolate mildew, several fungicide applications are routinely employed. Despite tebuconazole widespread usage, there is no evidence of field resistance to this fungicide, as well as there is no apparent risk of cross-resistance between tebuconazole and carbendazim.

Selection of insensitive individuals to benzimidazole fungicides is well-known for many groups of plant pathogenic fungi (LaMondia & Douglas, 1997). Benzimidazole resistance has developed independently in a number of fungal species and it has always been associated with point mutations in the β -tubulin gene (Yarden & Katan, 1993). The cutoff ED₅₀ values for sensitivity may differ depending on the pathogen. *Botrytis cinerea* strains were considered resistant if ED₅₀ > 250 $\mu\text{g/mL}$ for benomyl or > 1000 $\mu\text{g/mL}$ for thiophanate-methyl (LaMondia & Douglas, 1997). For

Monilinia fructicola isolates with ED₅₀ values below 2 µg/mL were considered sensitive to thiophanate-methyl, isolates with values between 2 and 30 µg/mL were considered low-resistant, and above 30 µg/mL high-resistant (Yoshimura *et al.*, 2004). Isolates of *Helminthosporium solani* were considered resistant to benomyl if able to grow on media amended with 35 µg of benomyl/mL and resistant to thiophanate-methyl if able to grow on media amended with 400 µg of thiophanate-methyl/mL (Cunha & Rizzo, 2003). We used the previously mentioned values as guidelines for assessing sensitivity of Cgc to carbendazim, a benzimidazole fungicide. For Cgc, one reason for non emergence of carbendazim resistant strains is the frequent use of a fungicide mixture (carbendazim and fentin hydroxide) and a gradual substitution of these molecules by novel ones.

Growth inhibition by strobilurin fungicides can be due to sensitivity to fungicide or activation of an alternative respiration pathway by a fungus (Miguez *et al.*, 2003). The narrow range of ED₅₀ values for azoxystrobin suggests that an alternative oxidase pathway was not activated or had only a slight effect on Cgc. By analyzing both measuring spore germination in tests with strobilurins and the oxidase pathway, it was possible to distinguish between resistant or sensitive isolates of *Mycosphaerella fijiensis* (Chin *et al.*, 2001) and *Alternaria solani* (Pasche *et al.*, 2004). The site of action of QoI fungicides can in principle be bypassed by an alternative oxidase, which is inhibited by salicylhydroxamic (SHAM) acid or propyl gallate (Miguez *et al.*, 2003). In this work we measured *in vitro* colony growth, and apparently no Cgc isolates had an alternative active oxidase route.

For sensitive isolates of *C. graminicola* to azoxystrobin, ED₅₀ values ranged from 0.01 to 0.12 µg/mL whereas in resistant isolates ED₅₀ values were always higher than 10 µg/mL. The alternative oxidase inhibitor SHAM in this pathogen had only slight effect on *in vitro* growth (Avila-Adame *et al.*, 2003). Our ED₅₀ values for azoxystrobin fit in the interval for *C. graminicola* sensitive strains (0.019 to 0.068 µg/mL).

Studies with plant pathogenic fungi in which strobilurin resistance was examined at the molecular level, revealed that resistance often correlates with a point mutation in target cytochrome *b* gene. Replacement of glycine by alanine at amino acid codon 143 makes an individual resistant to strobilurin (Sierotzki *et al.*, 2000, Ishii *et al.*, 2001, Avila-Adame & Köller, 2003). Nevertheless in some cases other mutations are also present (Avila-Adame *et al.*, 2003). At this time, analysis of our strains at the molecular level are not necessary, because the azoxystrobin ED₅₀ values were low and

relatively uniform. Constant Cgc population monitoring is necessary to detect any shift in a population, particularly in areas where fungicide usage is more frequent.

Our results set an optimistic scenario regarding usage of both fungicides tested. Alternation of fungicide and use of mixtures, as of two fungicides with different mode of action, may have contributed to these results. The frequent use of protectant fungicides like fentin hydroxide, commonly sprayed to reduce production costs, or copper compounds, used to control bacterial blight, must have played an important role in controlling putative resistant strains at low frequency in population. The inefficiency of wind dispersal of Cgc compared with other pathogens, may also have contributed negatively to the establishment of resistant strains. Considering a total area sowed with cotton of about 736,700 hectares in the 2002/2003 season (Kist *et al.*, 2004), it is likely that population of isolates was too low to detect resistance. This was the first survey of fungicide resistance to a cotton pathogen in Brazil and the results do not support any lack of efficacy due to fungicide resistance.

Fungicide applications were not effective in preventing yield loss. The mean yield in the uninoculated plots and unsprayed with fungicides was about 3,042 kg/ha whereas in the uninoculated and sprayed, as treatment 7, it reached 3,832 kg/ha. Two reasons may explain the inefficiency of fungicide sprays: 1. delayed first spray, considering that over sprouting had already started; and 2. continuous rains between sprays, which could have washed off fungicides with low tenacity and increased dispersal of Cgc conidia. Therefore, it is recommended that growers spray as soon as the first symptoms (necrotic lesions on young leaves) appear instead of waiting for severe symptoms to show up. At the last assessment date in the disease progress curve for the control, there is a distortion, because of the lack of fungicide protection in the new vegetative ramifications. This is in accordance with growers complaints about the lack of fungicide efficacy and is related to the heavy rains for several days during the vegetative stage.

It was not possible to make inferences about the performance of an individual fungicide, because almost all treatments were not applied sequentially. All fungicides treatments resulted in less disease than in the control. However, the best fungicide combination in reducing ramulose severity failed to assure an acceptable yield, when compared with uninoculated plots. In uninoculated plots, the normal growth was established and bolls production occurs in whole plant while in inoculated plots only few bolls were produced on the upper parts of the canopy, due to the development of vegetative branches instead of reproductive

ones. The excessive vegetative development on inoculated plants also affected in some way the sap flow resulting in less boll production in other non diseased reproductive branches. The first fungicide application was delayed to assure disease establishment (emission of lateral branches) and this could have contributed to the lack of optimal control because at this time the plant meristem already had been killed.

Cotton is the most profitable crop in Central Brazil, but the same cultivars are commonly grown year after year in the same areas. This can contribute to initial inoculum build up in crop debris. Moreover, as discussed above, in very wet conditions it may be impossible to spray fungicides at all, considering large areas. Tank-mix involving growth regulators, insecticides, foliar nutrients, and even selective herbicides, frequently used to minimize application costs, can contribute to reduce fungicide effect by incompatibility. Thus, this mix should be avoided. Good crop management practices, especially crop rotation, and sanitation procedures to reduce seed contamination, associated with fungicide reducing risk practices will certainly improve ramulose management and extend life span of fungicides.

Table 1. Isolates of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* used to inoculate cotton plants in a field trial designed to assess the efficacy of different fungicides.

Code	County-State	Original cultivar	Coordinates*
Cgc002	Sapezal - MT	Ita-90	-58°50'24"/-13°50'11"
Cgc010	Viçosa - MG	Delta Opal	-42° 52'55"/-20° 45'14"
Cgc019	Acreúna - GO	BRS-Ipê	-50°12' 07"/-17°33'21"
Cgc037	Santa Helena de Goiás - GO	BRS-Ipê	-50°40' 04"/-17°37'53"
Cgc061	Campo Verde – MT	FM966	-55°08' 22"/-15°14'54"
Cgc097	Alto Taquari – MT	Not identified	-53° 16'56"/-17° 49'34"

* Longitude/Latitude

Table 2. Numerical rating scale for assessing ramulose severity on cotton plants.

C ode	Symptoms description
1	No apparent symptoms
2	Necrotic spots on young leaves, no over sprout, no stunting
3	Necrotic spots on leaves, shortening of internodes, and beginning of over sprout (about 3 new buds), no plant stunting
4	Necrotic spots on leaves, shortening of internodes, and over sprout (more than 4 buds), reduced vegetative growth
5	Necrotic spots on leaves, shortening of internodes, and over sprout (more than 10 buds), plant stunting

Table 3. Treatments, application time, and dosage used in a field experiment of ramulose chemical control on artificially inoculated cotton cultivar BRS Ipê.

	Fungicide applications		w ²	AUDPC ³	Yield (kg/ha)
	44 DAI ¹	64 DAI			
1	Azoxystrobin+Cyproconazole (60+24*)	Pyraclostrobin (100)	50.74 a	1993.6 b	1572.45 ab
2	Azoxystrobin (75)	Thiophanate-methyl (600)	51.84 a	1915.7 ab	1509.15 ab
3	Azoxystrobin (75)	Pyraclostrobin (100)	46.01 a	1775.9 ab	2138.10 b
4	Trifloxystrobin+Cyproconazole (56,25+24)	Carbendazim+Fentin Hydroxide (250+250)	47.83 a	1874.8 ab	1833.45 ab
5	Trifloxystrobin+propiconazole (62,5+62,5)	Carbendazim+Fentin Hydroxide (250+250)	40.62 a	1605.6 a	1862.85 ab
6	Pyraclostrobin+Epoxyconazole (66,5+25)	Pyraclostrobin (100)	50.31 a	1893.3 ab	1891.8 ab
7	Pyraclostrobin (100)	Pyraclostrobin+Epoxyconazole (66,5+25)	48.59 a	1847.9 ab	2068.05 ab
8	Azoxystrobin (75)	Azoxystrobin+Cyproconazole (60+24)	49.24 a	1865.8 ab	2052.15 ab
9	Thiophanate-methyl (600)	Thiophanate-methyl+Flutriafol (500+50)	47.85 a	1799.6 ab	2022.6 ab
10	Thiophanate-methyl (500)	Thiophanate-methyl+Tetraconazole (500+50)	48.37 a	1813.9 ab	1839.75 ab
11	Carbendazim (500)	Carbendazim (500)	59.41 a	1824.8 ab	1904.85 ab
12	Control (water)	Control (water)	70.53 b	2133.4 b	1169.4 a
Mean			50.115	1862.02	1822.05
CV			11.54	9.038	23.76
P			0.00001	0.0071	0.0436

1- Days after inoculation. 2- Disease Index, calculated according to Amaral (1969) from data obtained in the last assessment (65 days after inoculation); 3- Area under the disease progress curve . *- grams of active ingredient/hectare. Means are from five replicates. Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Tukey, $\alpha = 0.05$). CV = coefficient of variation. P = level of significance.

Figure 1. Baseline (boxes) and non baseline (circles) populations of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* sampled in cotton growing areas of Brazil.

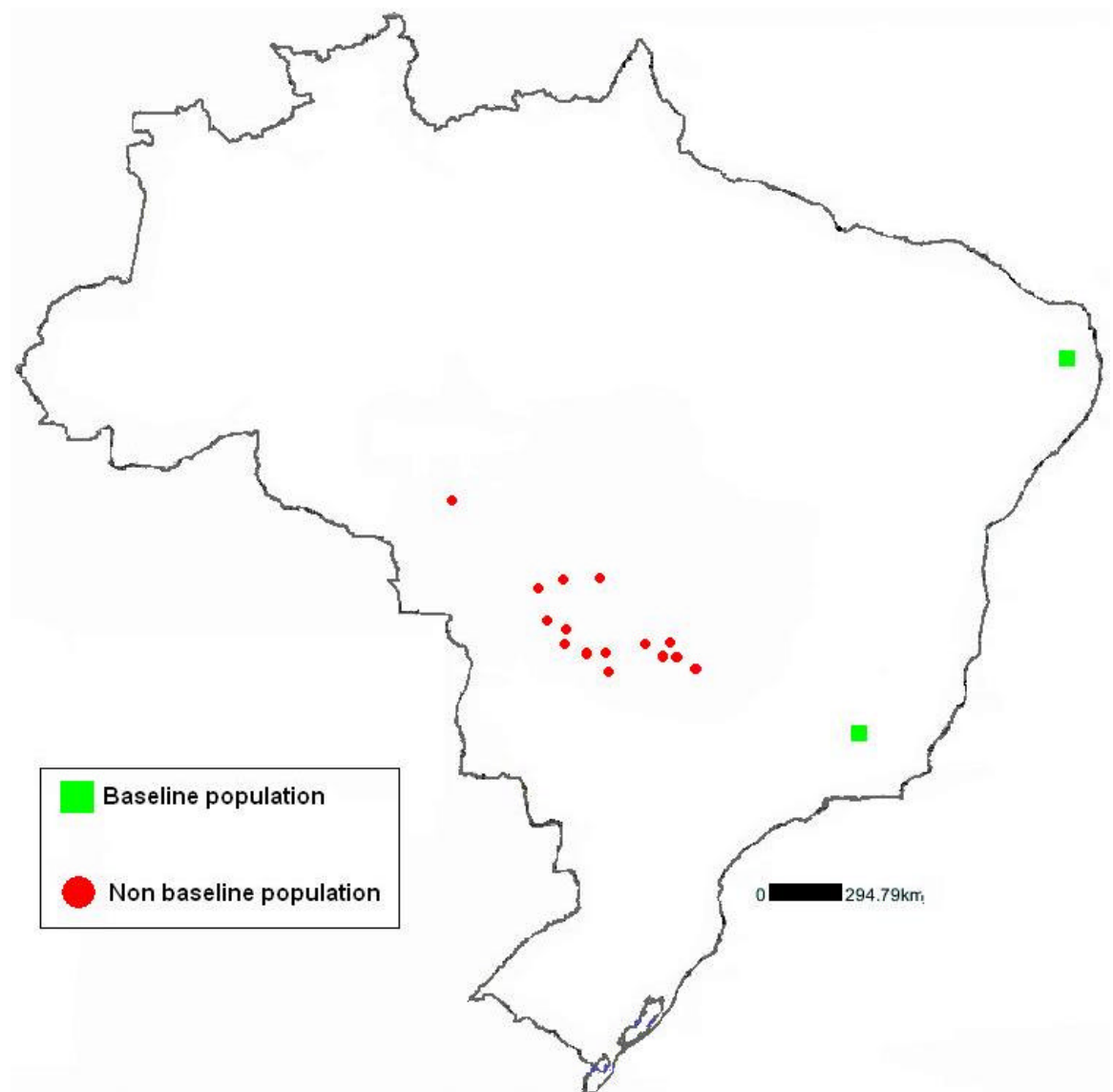


Figure 2. Distribution of values for 50% effective dosage (ED_{50}) of tebuconazole in nonbaseline (n=91) and baseline (n=11) populations of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

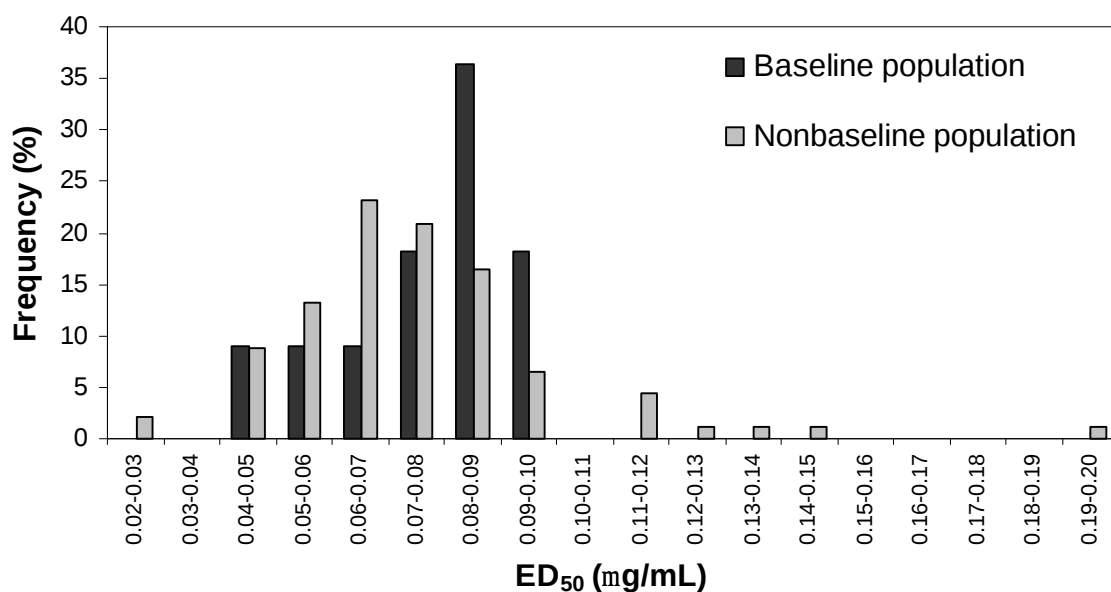


Figure 3. Distribution of values for 50% effective dosage (ED_{50}) of carbendazim in nonbaseline (n=88) and baseline (n=11) populations of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

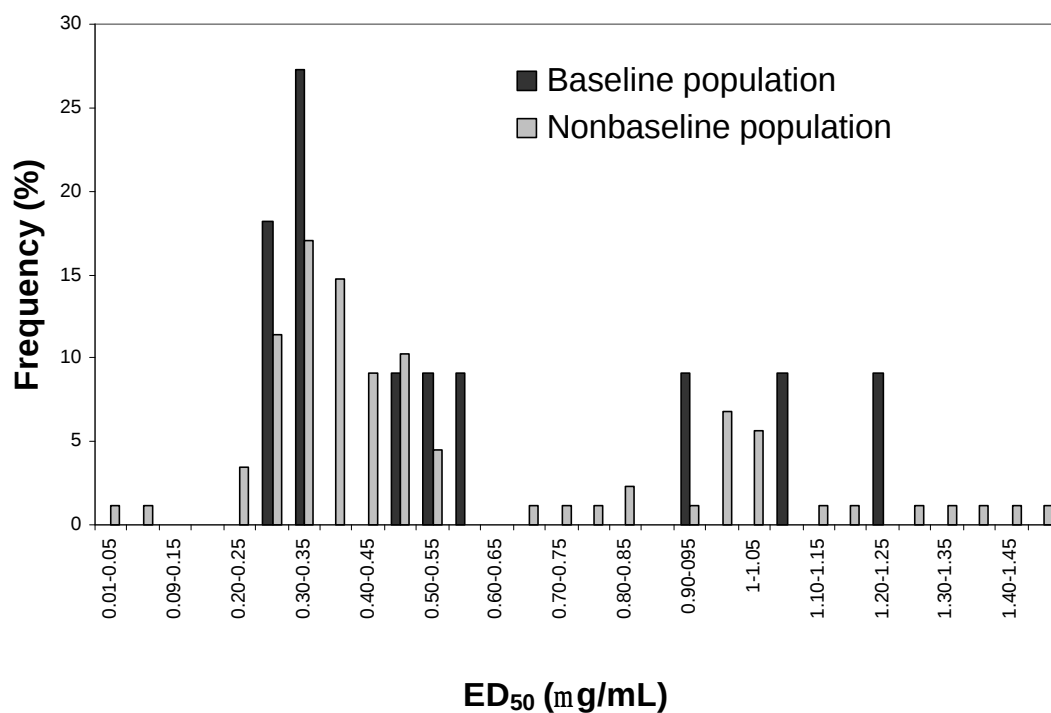


Figure 4. Distribution of values for 50% effective dosage (ED_{50}) of azoxystrobin in nonbaseline (n=82) and baseline (n=11) populations of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

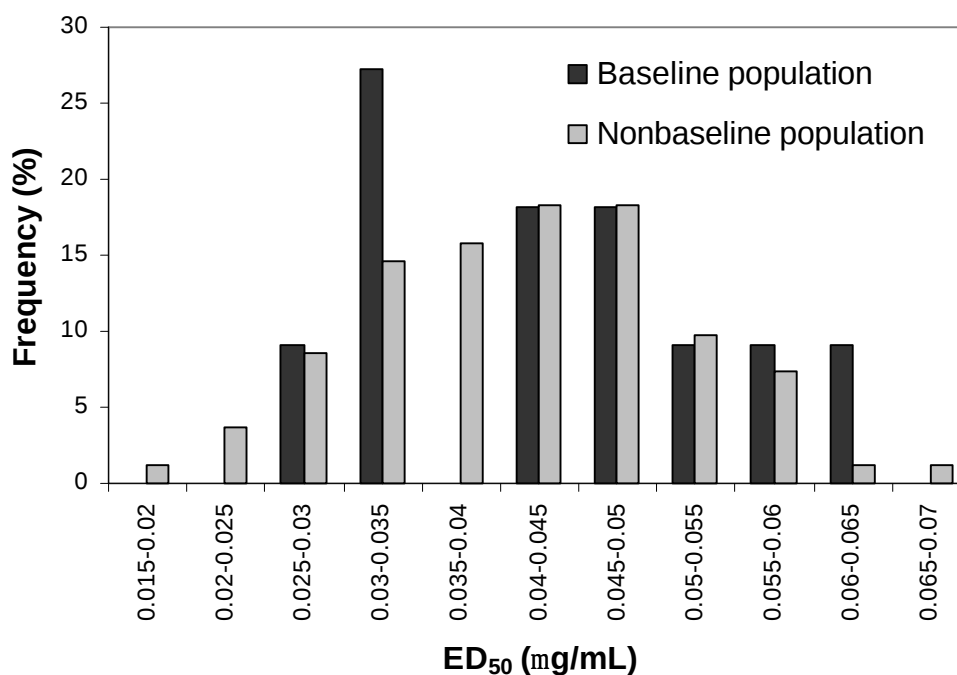
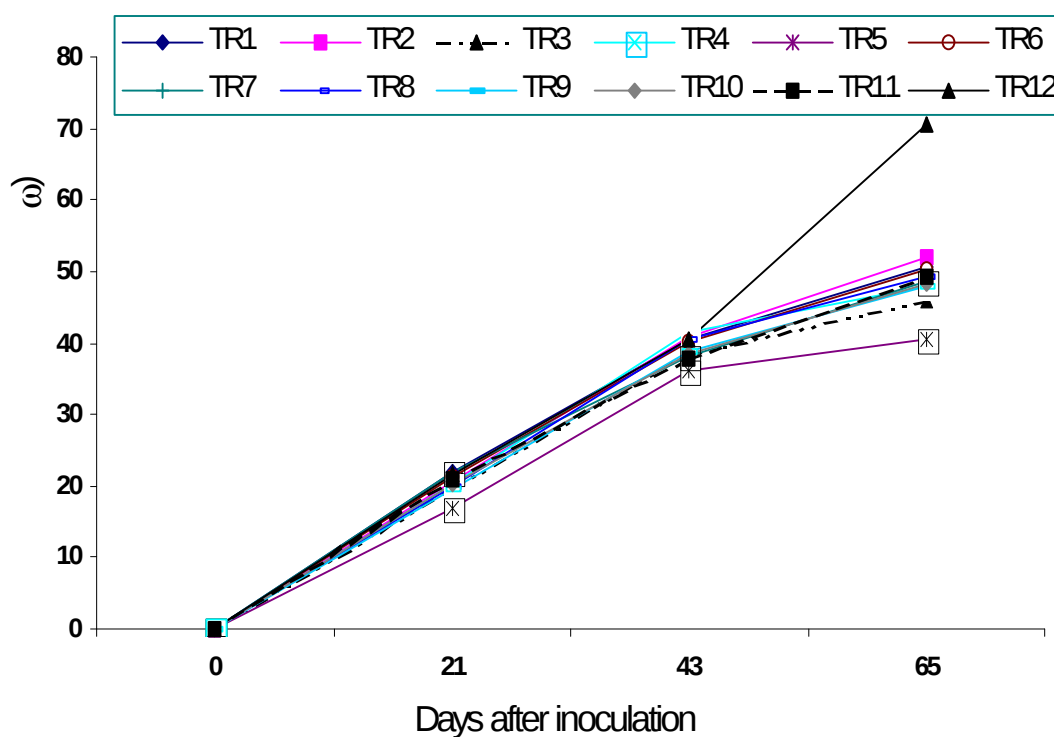


Figure 5. Progress curve of cotton ramulose after two fungicide applications at 44 and 64 DAI (TR = Treatments – Table 3).



LITERATURE CITED

- Amaral, E. Novo índice de intensidade de infecção. Pesquisa Agropecuária Brasileira 4: 1-2. 1969.
- Araújo, A. E. & Suassuna, N. D. Guia de identificação e controle das principais doenças do algodoeiro no Estado de Goiás. Embrapa Algodão. Documentos, 113 40 p. 2003.
- Avila-Adame, C. & Köller, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. Current Genetics 42: 332-338. 2003.
- Avila-Adame, C., Olaya, G. & Köller, W. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to Strobilurin-Related QoI fungicides. Plant Disease 87: 1426-1432. 2003.
- Brent, K. J. & Hollomon, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk. ed. Brussels. Global Crop Protection Federation. 1998.
- Chin, K. M., Wirz, M. & Laird, D. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. Plant Disease 85: 1264-1270. 2001.
- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. Revista de Agricultura 12: 249-259. 1937.
- Costa, A. S. & Fraga Jr., C. G. Sobre a natureza da "ramulose" ou "superbrotamento" do algodoeiro. Jornal de Agronomia 2: 151-160. 1939.
- Cunha, M. G. & Rizzo, D. M. Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* populations from California. Plant Disease 87: 798-803. 2003.
- Czermainski, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de doenças em plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 1545-1555. 1999.
- Fry, W. E. Integrated control of potato late blight - Effects of polygenic resistance and techniques of timing fungicide applications. Phytopathology 68: 1650-1655. 1977.
- Gisi, U., Chin, K. M., Knapova, G., Kung Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H. & Steinfeld, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Protection 19: 863-872. 2000.
- Gisi, U., Hermann, D., Ohl, L. & Steden, C. Sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different classes of fungicides. Pesticide Science 51: 290-298. 1997.
- Hsiang, T., Yang, L. & Barton, W. Baseline sensitivity and cross-resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. European Journal of Plant Pathology 103: 409-416. 1997.

- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. & Hollomon, D. W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166-1171. 2001.
- Kim, Y. S., Dixon, E. W., Vincelli, P. & Farman, M. L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891-900. 2003.
- Kist, B. B., Reetz, E., Santos, C., Beling, R. R. & Corrêa, S. Brazilian Cotton Yearbook. ed. Santa Cruz do Sul - RS. Gazeta Santa Cruz. 2004.
- LaMondia, J. A. & Douglas, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 81: 729-732. 1997.
- Lima, E. F. & Chaves, G. M. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira* 17: 61-66. 1992.
- McGrath, M. T. Fungicide resistance in Curcubit Powdery Mildew: experiences and challenges. *Plant Disease* 85: 236-245. 2001.
- Miguez, M., Reeve, C., Wood, P. M. & Hollomon, D. W. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* QoI fungicides. *Pest Management Science* 60: 3-7. 2003.
- Miranda, J. E. & Suassuna, N. S. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Embrapa Algodão: Circular Técnica 76 48. 2004.
- Pasche, J. S., Wharam, C. M. & Gudmestad, N. C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. *Plant Disease* 88: 181-187. 2004.
- Sierotzki, H., Wullschleger, J. & Gisi, U. Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 107-112. 2000.
- Smith, D. & Onions, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. ed. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 1983.
- Thaxton, P. M. & El-Zik, K. M. Season-long diseases. In: T. L. Kirkpatrick and C. S. Rothrock (Ed.) *Compendium of Cotton Diseases*. St. Paul. APS Press. 2001. pp. 34-35.
- Yarden, O. & Katan, T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483. 1993.
- Yoshimura, M. A., Luo, Y., Ma, Z. & Michailides, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodione, and tebuconazole. *Plant Disease* 88: 373-378. 2004.

CONCLUSÃO GERAL

Há evidências que a população estudada de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tem estrutura clonal.

Não há evidências de indivíduos resistentes a carbendazim, tebuconazole e azoxystrobin.

Existem acessos de algodoeiro com resistência à ramulose e é possível diferenciar raças do patógeno em uma série de plantas diferenciadoras