

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS  
EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO**

**MARCELO HENRIQUE LISBOA RENNÓ**

**BRASÍLIA - DF**

**MAIO/2017**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS  
EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO**

**MARCELO HENRIQUE LISBOA RENNÓ**

**ORIENTADOR: Adalberto Corrêa Café Filho**

**BRASÍLIA - DF**

**MAIO/2017**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS  
EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM FITOPATOLOGIA.

**APROVADA POR:**

---

**Adalberto Corrêa Café Filho, Ph.D., Professor Titular, Dept. de Fitopatologia - UnB**  
**Endereço para correio eletrônico: [cafeilh@unb.br](mailto:cafeilh@unb.br)**

---

**Daniel Anacleto Costa Lage, D.Sc, Bayer CropScience**  
**Endereço para correio eletrônico:**

---

**Nelson Suassuna, D.Sc, Embrapa Algodão**  
**Endereço para correio eletrônico:**

**BRASÍLIA/DF, 25 de maio de 2017.**

RENNÓ, MARCELO HENRIQUE LISBOA

CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL ESTIMATIVA DE PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO / Marcelo Henrique Lisboa Rennó; orientação de Adalberto Corrêa Café Filho;, Brasília, 2017.

Dissertação de pós-graduação em Fitopatologia – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 2017.

1. *Ramularia areola* 2. *Ramulariopsis pseudoglycines* 3. *Gossypium hirsutum* 4. Diversidade de fitopatógenos 5. Epidemiologia 6. Café Filho, A. C.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

**RENNÓ, M.H.L. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL ESTIMATIVA DE PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO** Brasília: Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 2017.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

NOME DO AUTOR: Marcelo Henrique Lisboa Rennó

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL ESTIMATIVA DE PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DA MANCHA DE RAMULÁRIA DO ALGODOEIRO GRAU: MESTRE FITOPATOLOGIA ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Marcelo Henrique Lisboa Rennó

CPF: 089.715.006-62

Endereço para correio eletrônico: marcelo.lisboarenno@gmail.com

## **DEDICAÇÃO**

*In memoriam* ao meu avô Antônio, mesmo sem conhecê-lo, transmitiu-me sua motivação incrível pela pesquisa e a busca das respostas dos questionamentos de seu tempo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos amigos que fiz na Universidade de Brasília, que me receberam desde o primeiro dia com muito companheirismo e afeto. Em especial a Jamile, Moana e Cristiano que sempre transmitiram motivação e apoio a minha jornada.

Ao meu orientador, Adalberto Correa Café Filho, pelo apoio incondicional as minhas atividades, a sua compreensão e paciência aos desafios que o projeto nos proporcionou.

A minha esposa Cibelle, que compartilhou de toda minha trajetória acadêmica, das conquistas aos dissabores. Sendo determinante em muitas das decisões que tomei.

A minha família, que me passou muita confiança ao sempre demonstrar que acreditava na capacidade de superação dos desafios que enfrentava. Em especial a minha avó, que apesar das dificuldades buscou sempre estar presente.

Aos amigos da fitopatologia de Lavras, que ao construírem minha base científica, foram determinantes para o desenvolvimento desta dissertação.

A SLC agrícola que me proporcionou essa experiência incrível de ganho de conhecimento e de relações interpessoais, sendo protagonista no crescimento de minha carreira profissional.

## SUMÁRIO

ABSTRACT .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
1.1 A CULTURA DO ALGODOEIRO .....	14
1.2 ETIOLOGIA DA MANCHA DE RAMULÁRIA .....	16
1.3 IMPORTÂNCIA, EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MANCHA DE RAMULÁRIA .....	18
1.4 OBJETIVOS GERAIS .....	20
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
<b>CAPÍTULO 1</b> <b>Caracterização molecular do agente causal da Mancha de Ramulária</b> <b>27</b>	
RESUMO .....	28
ABSTRACT .....	29
INTRODUÇÃO .....	30
MATERIAL E MÉTODOS .....	32
OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	32
EXTRAÇÃO DE DNA .....	32
AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	33
ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS .....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
CONCLUSÃO .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
<b>CAPÍTULO 2</b> <b>Determinação de parâmetros epidemiológicos de isolados de Ramulariopsis pseudoglycines</b> .....	<b>41</b>
RESUMO .....	42
INTRODUÇÃO .....	44
MATERIAL E MÉTODOS .....	45



ÉPOCA E CONDIÇÕES GERAIS DO EXPERIMENTO .....	46
PRODUÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS .....	46
AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

Rennó, Marcelo Henrique Lisboa. Caracterização do agente causal e estimativa de parâmetros epidemiológicos da mancha de ramulária do algodoeiro, 2017. Mestrado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A incidência de doenças na cultura do algodoeiro tem restringido o aumento em produtividade em todas as regiões produtoras no Brasil. Dentre elas a Mancha de ramulária é a principal doença foliar do algodoeiro do Brasil. Com a expansão das áreas cultivadas para o Cerrado, a doença passou a se manifestar mais cedo provocando desfolha prematura, e conseqüentemente, a redução do potencial produtivo. O agente causal é tradicionalmente identificado como *Ramularia areola*, mas trabalhos recentes, com pouca representação de isolados nacionais transferiram o agente causal para *Ramulariopsis pseudoglycines*. Entretanto, uma amostragem representativa das populações brasileiras de *R. areola* ainda não foi estudada frente a esta classificação, para confirmar a identidade do agente causal no país. Além disso, a introdução recente de genótipos suscetíveis de algodão de origem australiana e americana, onde a doença é menos importante, tem levado a diversos surtos epidêmicos. O uso de defensivos químicos tem sido a principal forma de controle dessa doença, mas acarreta prejuízos ambientais. Além disso, aplicações intensivas de fungicidas podem induzir a seleção e prevalência de populações do patógeno resistentes aos princípios ativos mais empregados. A utilização de variedades resistentes é uma excelente alternativa de manejo, mas também induzem mudanças na composição da população do patógeno para superação de resistência do hospedeiro. O conhecimento das populações do patógeno predominantes em cada região produtora é fundamental para que os programas de melhoramento desenvolvam cultivares com resistência ampla e durável. Com base na ramificação dos conidióforos a partir da base o agente causal da doença foi transferido de *Ramularia areola*, para *Ramulariopsis gossypii*.

Recentemente estudos moleculares revelaram a existência de uma nova espécie (*Ramulariopsis pseudoglycines*) associada com a mancha de ramulária. Adicionalmente, é possível que essa doença seja causada por um complexo de espécies, como descrito em outros patossistemas. Portanto uma amostragem representativa das populações brasileiras de *Ramulariopsis* spp. é fundamental para a identificação precisa do patógeno e conseqüentemente para o controle eficiente da doença. Diante disso esse trabalho teve como objetivos verificar a espécie predominante de *Ramulariopsis* que ocorre nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil e avaliar isolados representantes de cada região, quanto a parâmetros epidemiológicos do patossistema algodão-ramularia. A caracterização molecular de 93 isolados representativos das principais regiões produtoras de algodão no país, revelou que todos os espécimes pertenceram a *R. pseudoglycines*. Nos ensaios de avaliação dos parâmetros epidemiológicos com cinco isolados, em condições controladas, os isolados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso causaram maiores incidência e severidade agressivos na cultivar susceptível cv. FM 975WS que os isolados do Maranhão, Bahia e Goiás. Além disso, o período de incubação dos isolados mais agressivos foi cinco dias menor que o dos isolados menos agressivos na cultivar susceptível. Quando avaliados na cultivar resistente cv. BRS 372 não foi superada por todos os isolados testados, com menores índices de doença. As cvs. TMG 47B2RF e DP 1648B2RF não apresentaram sintomas quando inoculados com quaisquer dos cinco isolados testados.

Palavras-chave: mancha de ramulária, míldio cinzento, *Ramulariopsis pseudoglycines*, *Ramularia areola*, epidemiologia.

## ABSTRACT

Rennó, Marcelo Henrique Lisboa. Characterization of the causal agent and estimation of epidemiological parameters of cotton areolate mildew in Brazil, 2017. Mestrado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Incidence of cotton diseases restricts increases of crop yield in all Brazilian producing regions. Among these diseases, the *Ramularia* leaf spot is the most important foliar disease in cotton in Brazil. Due to the expansion of cultivated areas to the Cerrado region, the disease now arises earlier, causing premature defoliation and, consequently, reduction in yield. Causal agente is traditionally referred to as *Ramularia* areola, but recente work, with few representatives of Brazilian isolates transferred the causal agent to *Ramulariopsis pseudoglycines*. So far, a representative study of Brazilian *R. areola* isolates has not been undertaken. In addition, the recent introduction of cotton susceptible genotypes from Australia and the United States, where the disease is less important, has been associated to several epidemic outbreaks. Nowadays, the use of pesticides is the most important control strategy of this disease, but intensive use of chemicals lead to environmental risks. However, intensive sprayings of fungicides may lead to resistant pathogen populations. The use of resistant varieties is an excellent management alternative due to its high efficiency and low environment impact, but reliance on major host resistance genes also pressures pathogen population towards resistance breakdown. Understanding the mechanisms of resistance and the variability of the pathogen populations in co-evolution with the plant host are essential for breeding programs focused on developing resistant cultivars. Based on the ramification of the conidiophores, the causal agent of ramularia leaf spot was transferred from *Ramularia aerola* para *Ramulariopsis gossypii*, and recently, molecular characterization revealed still another

entity associated to ramularia leaf spot, *Ramulariopsis pseudoglycines*. Additionally, it is possible that the disease is caused by a complex of species, as it has been described in other pathosystems. Thus, a study of a representative sample of the Brazilian populations *Ramulariopsis* spp. is fundamental for the precise identification of the pathogen and for the efficient disease management. Therefore, this work aimed to identifying the predominant species of *Ramulariopsis* occurring in the Brazilian cotton growing regions and to evaluate representative isolates of each locality as to epidemiological parameters of the cotton-ramularia pathosystem. Molecular characterization of 93 isolate representative of the main Brazilian cotton growing regions showed that all specimens belonged to *R. pseudoglycines*. In the assays for evaluation of epidemiological parameters, with five isolates, in controlled conditions, representatives of the states of Mato Grosso do Sul and Mato Grosso caused higher disease incidence and severity in the susceptible cv. FM 975WS than the isolates from the states Maranhão, Bahia and Goiás. Furthermore, period of incubation of the most aggressive isolates was five days shorter than the ones of the least aggressive isolates in the susceptible cultivar. When tested against the resistant cultivar BRS 372, resistance was overcome by all isolates, albeit with lower disease levels. Cultivars TMG 47B2RF and DP 1648B2RF did not show any disease symptoms when inoculated with any one of the five isolates studied.

Key words: Ramularia leaf spot, *Ramularia areola*, epidemiology, areolate mildew, grey mildew

## 1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A CULTURA DO ALGODOEIRO

O algodoeiro é uma planta da família Malvaceae, pertencente ao gênero *Gossypium*. O gênero é constituído por cerca de 50 espécies, sendo que destas, 45 são diploides e seis são alotetraplóides. Das espécies cultivadas, *Gossypium arboreum* L. e *G. herbaceum* L. são diploides ( $2n = 2x = 26$ ) e nativas do velho mundo. As espécies cultivadas alotetraplóides ( $2n = 4x = 52$ ), *Gossypium hirsutum* e *G. barbadense*, são nativas das Américas e de maior relevância econômica para a indústria têxtil (Carvalho, 2008). A espécie *Gossypium hirsutum* representa 90% da produção mundial de algodão, com alto aproveitamento de fibras (Freire, 2015).

A maior parte das espécies é oriunda de uma faixa geográfica que compreende regiões tropicais e subtropicais. O crescimento do algodoeiro é favorecido por temperaturas altas, próximas a 28 °C e limitado por temperaturas baixas (Burke, 1990). O algodoeiro é uma planta perene, no Brasil a cultura é conduzida por cinco a sete meses, com período de florescimento e frutificação de 40 a 70 dias. Esse fator permite ao algodoeiro brasileiro uma janela maior de oportunidade de compensação e recuperação de qualquer fator de estresse ambiental que possa ter ocorrido durante a fase de floração (Rosolem, 2014).

Na década de 90, o país era um dos principais importadores de algodão no mundo. Em 1996 chegou a importar 472 mil toneladas de algodão ocupando o lugar de maior importador mundial do produto (CONAB, 2016). Este cenário foi reflexo de problemas na comercialização de plumas de baixa qualidade e problemas fitossanitários como a introdução do bicudo (*Anthonomus grandis*) do algodoeiro nos cultivos nas principais regiões produtoras da época, os estados do Paraná, São Paulo e a região Nordeste. No processo de retomada, a partir dos anos 2000, a cotonicultura brasileira foi distribuída principalmente em regiões de

cerrado, nos estados do Mato Grosso e oeste da Bahia por apresentarem condições edafoclimáticas favoráveis e, até então, ausência do bicudo do algodoeiro (Santos & Santos, 1997; Kouri & Santos, 2006).

Atualmente o Brasil é o quinto maior produtor de algodão no mundo, com projeção de cultivo para a safra 2016/17 de 1.447 milhões de toneladas de pluma; Índia, China, Estados Unidos e Paquistão em ordem decrescente configuram a lista dos quatro maiores produtores mundiais de fibra de algodão (ICAC, 2016). No Brasil, a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) divulgou a primeira estimativa para a safra 2016/17 de 902,3 mil hectares, com redução de 5,4% de área plantada em relação ao ano anterior. Na safra 2015/16 a área global foi reduzida em 10,8% e, em 2016/17, há estimativa de redução de mais 3,4% de área plantada no mundo (USDA, 2016). Entre os principais países produtores, as maiores reduções previstas para 2016/17 estão no Paquistão (-14,3%), Índia (-9,7%) e China (-8,2%). A forte concorrência com fibras sintéticas, que tiveram o custo reduzido em função do preço do petróleo nos últimos anos, provocam reduções nos preços de fibras naturais fazendo que muitos produtores migrem para outras culturas mais rentáveis e de maior estabilidade. Entretanto a produção mundial será consideravelmente menor do que o consumo no ano de 2016, contribuindo para reduções de estoques mundiais de algodão. A China lidera os estoques, e atravessou um ciclo de acúmulo de estoques entre 2011 e 2014 com estagnação em 2015. Após esse período o governo chinês vem consumindo seus estoques, influenciando os preços praticados das próximas safras.

O Brasil detém a sexta colocação no ranking mundial de produtividade entre os países, que é liderado pela Austrália, seguido de Israel, China, México e Turquia, porém o Brasil é o primeiro colocado em produtividades de algodão de sequeiro (ICAC, 2017). Com uma área cultivada em uma região tropical, com alto índice pluviométrico e temperatura noturnas amenas, o Brasil está sujeito a maiores interferências de ataques de pragas e doenças,

restringido o aumento em produtividade em todas as regiões produtoras no Brasil (Freire, 2011).

Dentre as doenças da cultura, destaca-se a mancha de ramulária, principal doença da cotonicultura brasileira que tem importância secundária nos demais países produtores. A doença provoca desfolha prematura do algodoeiro provocando grave redução no potencial produtivo.

## 1.2 ETIOLOGIA DA MANCHA DE RAMULÁRIA

A mancha de ramulária em algodoeiro foi originalmente relatada em 1883 (Videira et al, 2016), a partir de espécies examinadas do Brasil e Paraguai, descrita em 1886 como *Cercospora gossypii* Speg., Anales Soc. Ci. Argent. 22(4): 208. 1886 Posteriormente a doença foi diagnosticada em 1890 no estado do Alabama, Estados Unidos por Atkinson, que transferiu o patógeno para *Ramularia areola* G.F. Atk.. Nos anos seguintes a doença foi diagnosticada em diversos países como na Nigéria (Farquharson, 1914), Uganda (Small, 1916), Camboja (Vicens, 1921) e Austrália (Birmingham e Hamilton, 1923). Em 1993, a espécie foi reclassificada para *Ramulariopsis gossypii* (Speg.) U. Braun (Braun, 1993) e muito recentemente, um extenso estudo polifásico de *Ramularia sensu lato* transferiu o agente causal da mancha de ramulária para *Ramulariopsis pseudoglycines* (Videira et al., 2016). Esses autores observaram estruturas conidiogênicas em culturas e em espécime de herbário que revelaram conidióforos muito longos e semelhantes à *Ramulariopsis glycines* descrita originalmente em *Glycine javanica*, Zâmbia (Braun, 1998). Um clado foi altamente suportado pela análise filogenética como *Ramulariopsis pseudoglycines* Videira, Crous & Braun. Entretanto, o estudo de Videira et al. (2016) foi conduzido com aparentemente apenas dois espécimes obtidos de algodoeiro, sendo um do Brasil e outro do Togo. Nenhum estudo sistemático foi conduzido no Brasil após essas novas classificações para verificar a identidade



dos isolados brasileiros da mancha de ramulária do algodoeiro, que continua sendo referido na literatura nacional e internacional como *Ramularia areola*.

A fase teleomórfica foi descrita em 1932 como *Mycosphaerella areola* Ehrlich & F.A. Wolf (Ehrlich & Wolf, 1932). Segundo Bell (1981), todas as espécies cultivadas do gênero *Gossypium* são hospedeiras da *Ramularia areola*.

Os conídios são cilíndricos, hialinos e apresentam de um a três septos (Iamamoto, 2003). A faixa de temperatura entre 25 a 30 °C é ótima para a germinação e o desenvolvimento do tubo germinativo (Rathaiiah, 1977). Segundo Curvêlo (2009) a penetração do tubo germinativo de *R. areola* nas folhas de algodoeiro ocorre via estômato, porém, em alguns casos, o tubo germinativo é encontrado lateralmente às células guardas do estômato sem se dirigir para o interior da cavidade sub-estomática, o que pode indicar ausência de quimiotropismo, a penetração direta do tubo germinativo é descartada pois não encontrou formação de apressório. A mesma autora verificou que o fungo *R. areola* produziu uma grande quantidade de hifas e colonizou inter e intra celularmente a região do mesófilo foliar, sendo que aos 22 dias após a inoculação foi verificado o colapso celular e observada esporulação apenas em tecidos necrosados das folhas de algodoeiro com os conidióforos emergindo agrupados através dos estômatos aumentando a esporulação a partir dos 12 aos 22 dias após a inoculação ocorrendo nas faces adaxial e abaxial da folha.

Não existem relatos da doença incidindo sobre outras culturas, e, portanto postula-se que a sobrevivência entre cultivos se dá em plantas de algodoeiro remanescentes da destruição inadequada da soqueira, dos restos culturais ou de plantas voluntárias. A fase anamórfica *Ramularia areola* G.F. Atk. desenvolve-se em tecido vivo e por um curto período após abscisão foliar. A fase teleomórfica *Mycosphaerella areola* Ehrlich & F.A. Wolf, foi recentemente observada no Brasil em folhas de algodão em decomposição no solo, e pode ter importância epidemiológica, ao permitir a recombinação genética e variabilidade do patógeno

e ter um papel relevante na infecção primária através de ascósporos que desenvolvem sobre os restos culturais (Mehta, 2016).

### 1.3 IMPORTÂNCIA, EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MANCHA DE RAMULÁRIA

A mancha de ramulária ganhou importância na cotonicultura brasileira com o aumento de áreas cultivadas no cerrado, em regiões consideradas ideais para o desenvolvimento de doenças fúngicas, com altas temperaturas e umidade. Além disso, a introdução de genótipos de origem australiana e americana sem base de sustentação em programas de melhoramento no Brasil tem aumentado a surtos epidêmicos de patógenos antes considerados secundários da cultura.

Atualmente a mancha de ramulária é considerada a doença foliar mais importante na cotonicultura nacional, com redução de até 49% da produtividade (Aquino *et al.*,2008). Outros autores ( Mehta & Menten, 2006) afirmaram que, dentre as doenças causadas por fungos, a mancha de ramulária ocupa o lugar de maior importância, ocasionando perdas na produção de até 35%.

Os sintomas aparecem comumente em plantas no estágio F1 no surgimento da primeira flor. A mancha de ramulária é uma doença policíclica com disseminação de conídios via aérea, sob condições edafoclimáticas ideais e alta pressão de inoculo pode expressar os sintomas aos 40 dias após a emergência.

As primeiras lesões consistem em manchas angulosas nas folhas que variam de um a quatro mm, circunscritas pelas nervuras, mas em situações de alta severidade as lesões coalescem em grandes áreas. Inicialmente no campo os sintomas são verificados em folhas do terço inferior da planta, com lesões de coloração brancas azuladas na face abaxial das folhas, logo após é verificada a esporulação do fungo de aspecto pulverulento e branco. Com o

progresso da epidemia o fungo leva a desfolha precoce resultando em perda significativa de área fotossintética que por consequência leva a elevadas perdas em produtividade (Suassuna & Coutinho, 2007).

O controle químico é realizado com produtos à base de estano-orgânicos, benzimidazóis, triazóis, estrobirulinas e carboxamidas, sendo necessárias de sete a nove aplicações em cultivares suscetíveis. O controle mais eficiente da mancha de ramulária é obtido quando as aplicações de fungicidas são realizadas logo no aparecimento dos primeiros sintomas da doença, denominado por alguns autores como “mancha azulada” (Carretero & Siqueri, 2011). O atraso no início da primeira aplicação diminui a eficiência do controle e pode, inclusive, inviabilizar economicamente a aplicação do fungicida.

O controle químico, apesar de eficaz, afeta o meio ambiente e possui custo elevado. Dentre as estratégias de manejo empregadas no controle de doenças, a resistência genética é a mais desejável por reduzir o impacto ambiental e os custos de produção (Freire, 2015). A maioria das cultivares atualmente em uso no Brasil não possui resistência à doença em níveis adequados para dispensar o controle químico (Aquino et al., 2008). Atualmente existem as cultivares TMG 42 WS, TMG 43 WS, TMG 47 B2RF, BRS 371 RF, BRS 372 e BRS 416 B2RF no mercado. Cia *et al.* (2009) avaliaram 18 genótipos em 33 experimentos instalados nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil e verificaram que 61% dos genótipos apresentaram moderada a alta suscetibilidade e somente 29% foram classificados como moderadamente resistentes a mancha de ramulária. Zandoná *et. al* (2012) verificaram que plantas inoculadas em casa de vegetação apresentaram um gene dominante para mancha de ramulária e com herança simples, característica de resistência monogênica. Novaes *et al.* (2011) já haviam sugerido que estratégias de retrocruzamento poderiam ser incluídas nos programas de melhoramento do algodoeiro para resistência à doença.

Todavia, para que se tenha um programa de melhoramento efetivo, primeiramente é necessário o conhecimento da diversidade genética do patógeno (Pezenti *et al.*, 2013). Entretanto, infelizmente ainda são escassas as informações sobre a variabilidade do agente causal da mancha de ramulária do algodoeiro (Suassuna *et al.*, 2006; Curvêlo *et al.*, 2010; Zandoná *et al.*, 2012; Pezenti *et al.*, 2013).

Giroto *et al.*, (2013) relataram variabilidade genotípica e fenotípica dentro de 16 isolados de *R. areola* coletados de diferentes regiões geográficas do Brasil, mas não conseguiram encontrar relação entre essas variáveis e sua origem geográfica.

Desta forma, são necessários estudos filogenéticos e epidemiológicos mais aprofundados do patossistema algodão-Ramularia no Brasil, pois muito pouco é conhecido sobre as características genotípicas e fenotípicas dos isolados de cada região produtora, incluindo parâmetros quantitativos e qualitativos tais como agressividade, virulência e período de latência em diferentes genótipos comerciais de algodão.

#### 1.4 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a espécie predominante do agente causal da mancha de ramulária nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil.

#### 1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a mancha de ramulária é causada por uma única espécie ou um complexo.
- Caracterização molecular dos isolados provenientes das principais regiões produtoras de algodão no Brasil

- Avaliar a agressividade dos isolados em diferentes cultivares de algodão com níveis variáveis de resistência de campo à doença, através da estimativa de parâmetros epidemiológicos.

## 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, L. A.; BERGER, P. G.; RODRIGUES, F. A.; ZAMBOLIM, L.; OGOSHI, F.; MIRANDA, L.M.; LÉLIS. M. (2008) Controle alternativo da mancha de ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 34, p. 131-136.

ATKINSON G.F. (1890) A new *Ramularia* on cotton. *Bot. Gaz.* 15:166-168.

BELL A.A. (1981) Areolate mildew. In: Watkins GM. (ed.). *Compendium of Cotton Diseases*. APS Symp. Ser., St. Paul, Minnesota, United states 87 p.

BIRMINGHAM, W.A., HAMILTON, I.G. (1923) Diseases of the cotton plant. *Agr. Gaz. New South Wales* 34: 805-810, 877-886.

BRAUN, U. (1993). Studies on *Ramularia* and allied genera (VI). *Nova Hedwigia* 56:423-454.

BRAUN U, (1998). A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). Vol. 2. IHW-Verlag, Eching, Munich, Germany.

BURKE, J. J. (1990) Variation among species in the temperature dependence of the reappearance of variable fluorescence following illumination. *Plant Physiology*, 93(2), 652-656.

CARVALHO, L. P. de. O. (2008) gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N. E. de M. e AZEVEDO, D. M. P. de. (Org.). *O agronegócio do algodão no Brasil*. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. v.1, p.252-70.

CARRETERO, D. M.; SIQUERI, V. F. Resistência preservada. **Revista Cultivar**, Pelotas, p. 28-30, 2011.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; MARTINS, A.L.; MICHELOTTO, M. D.; ALMEIDA, W. P.; OLIVERIA, A. P. (2009) Reação de genótipos de algodoeiro à incidência da mancha de ramulária em condições naturais de infestação. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 7. 2009, Foz do Iguaçu. Anais... Campina Grande: EMBRAPA/Algodão, p.1452-1455. 1 CDROM.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. (2016) Disponível em: (<<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>> Acesso em: 28 NOV. 2016.

CURVÊLO, C. R. S. (2010) Processo infeccioso de *Ramularia areola* em algodoeiro. 2009. 33p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

EHRLIC, E., WOLF, F.A. (1932) Areolate Mildew of Cotton. *Phytopathology*, 22, 229-240.

FARQUHARSON, C.O. (1914) Plant diseases in Southern Nigeria. Ann. Rpt. Agr. Dept. So. Prov. Nigeria 1913: 41-55.

FREIRE E. C. (2011) História do algodoeiro no cerrado. In: Freire EC (Eds) Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, p.23-61. Pmid:22171824.

FREIRE, E. C. Algodão no cerrado do Brasil. Cap.1, Brasília, 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Gráfica e Editora Positiva 2015. Abrapa, 2015.

GIROTTI L.; MARANGONI, M. S.; MATOS, J. N.; GALBIERI, R.; ALMEIDA, W. P.; MEHTA, Y. R. (2013) Identification of Phenotypic and Genotypic Variability among the Isolates of *Ramularia areola* of Brazilian Cotton. American Journal of Plant Sciences, volume? p. 1893-1898.

IAMAMOTO M.M. (2003) Doenças foliares do algodoeiro. Editora Funep, 1. (Eds) 41p.

INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE (2016) Changes in Supply and Demand Estimates Since Last Week. October 20, 2016.

INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE (2017) Changes in Supply and Demand Estimates Since Last Week. 01 de março, 2017.

KOURI, J.; SANTOS, R. F. dos. A recuperação da produção do algodão no Brasil. In.: VI CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2006. Atas. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.

MEHTA, Y. R.; MENTEN, J. O. M. Doenças e seu controle. In: MORESCO, E. (Ed.).

Algodão – Pesquisas e Resultados para o Campo. v. 2, Cuiabá - MT, FACUAL, p.157-205, 2006.

MEHTA Y.R.; GALBIERI R.; MARANGONI M.; BORSATO L.C.; RODRIGUES H.P.; PEREIRA J.; MEHTA A. (2016) *Mycosphaerella areola* – The teleomorph of *Ramularia areola* of cotton in Brazil, and its epidemiological significance. *American Journal of Plant Sciences*. 1415-1422.

NOVAES, T. G.; ALMEIDA, W.P.; SCHUSTER, I.; AGUIAR, P.; MEHTA, Y. R. (2011) Herança de resistência do algodoeiro a *Ramularia areola*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 37, n. 2, p. 150-152.

PEZENTI, L. F.; BARBOSA, J.; VIEIRA, M. A.; MARANGONI, M. S.; VOLPONIL, J.; ALMEIDA, W. P.; GALBIERI, R.; MEHTA, Y. R. (2013) Phenotypic variability among isolates of *Ramularia areola* from Brazilian cotton. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 38 n. 4, p. 329-331.

RATHAIAH, Y. Spore germination and mode of cotton infection by *Ramularia areola*. *Phytopathology*. 67: 351-357. 1977.

ROSOLEM, C.A. (2014) O algodoeiro e os estresses abióticos: temperatura, luz, água e nutrientes. *Boletim P&D Instituto Mato grossense do Algodão - Cuiabá (MT)*, 2014.



SANTOS, R. F.; SANTOS, J. W. Crise na cadeia produtiva do algodão. Revista de Oleaginosas e Fibrosas, v.1, n.1, p.25-36. Campina Grande, 1997.

SHANER, G., & R. FINNEY. (1975). Inheritance of slow mildewing resistance in wheat. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 2:49 (Abstr.).

SMALL, W. (1916) Annual report of the government botanist for 1914-1915. Ann. Rpt. Dept Agr. Uganda Protect. 1914-1915: 57-70.

SPEGAZZINI (1892) Areolate mildew of cotton. In (Some diseases of cotton). Ala. Agr. Exp. Sta. Bul 41: 55-58.

SUASSUNA, N. D. (2006) Mapeamento da resistência do algodoeiro à mancha de ramulária (*Ramularia areola*) e variabilidade do patógeno no Estado do Mato Grosso. Relatório Final. Campina Grande: Embrapa Algodão/Fundação Centro –Oeste, 2006. 13p.

SUASSUNA N.D.; COUTINHO W.M. (2007) Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: Freire EC Algodão no cerrado do brasil. Brasília: Gráfica talento, p. 479-521.

USDA (2016) COTTON PRICE STATISTICS 2015-2016, disponível em < <https://www.ams.usda.gov/mnreports/cnAACPD.pdf> > September 2, 2016.

VIDEIRA S.I.R., GROENEWALD J.Z., BRAUN U., SHIN H-D, CROUS P.W. (2016) All that glitters is not Ramularia, *Studies in Mycology* (2016), doi: 10.1016/j.simyco.2016.06.001.

VICENS, F. (1921) Rapport sommaire sur les travaux effectués au Laboratoire de Phytopathologie de l'Indochine du Janvier 1919, auler Juliet 1921. Saigon: Imprimerie Commerciale, 19 pp. 1921. (From *Bul. Agr. Inst. Sci. Saigon* 3 307-323.

ZANDONÁ, C.; NOVAES, T. G.; NUNES, M. P.; ALMEIDA, W. P.; AGUIAR, P.H.; MORELLO, C. L.; SHUSTER, I.; MEHTA, Y. R. (2012) Mechanism of resistance and presence of different resistance genes to *Ramularia areola* in two cotton genotypes. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 37, n. 3, p. 175-178.

# CAPÍTULO 1

Caracterização molecular do agente causal da Mancha de Ramulária

## RESUMO

### Caracterização molecular do agente causal da Mancha de Ramulária

A mancha de ramulária é a principal doença foliar do algodoeiro no Brasil, gerando perdas econômicas significativas na cultura. Inicialmente o patógeno foi nomeado como *Ramularia areola* Atk., estudos recentes observaram que as estruturas conidiogênicas revelavam conidióforos muito longos e semelhantes ao gênero *Ramulariopsis* sp. Acredita-se que exista diversidade entre as populações do patógeno ou até mesmo espécies crípticas, uma vez que observações de campo verificaram suplantação local da resistência do hospedeiro, bem como recentemente foi descoberta à fase teleomórfica do patógeno indicando possível variabilidade. O objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização molecular dos isolados provenientes das principais regiões produtoras e verificar se a mancha de ramulária é causada por uma única espécie ou um complexo de espécies. Realizaram-se coletas de folhas com sintomas em 13 locais representativos, realizando o isolamento direto de 93 isolados, cultivados em BDA e estudados no âmbito da Coleção Micológica da Universidade de Brasília. Com os isolados procedeu-se a caracterização molecular, a partir da extração de DNA e realização da confirmação de identidade através do sequenciamento da região RPB2. Com base na amostragem estudada, apenas a espécie *Ramulariopsis pseudoglycines* se encontra confirmada no Brasil.

Palavras-chave: mancha de ramulária, *Ramularia areola*, *Ramulariopsis pseudoglycines*, filogenia.

## ABSTRACT

### Molecular characterization of the cotton areolate mildew causal agent

Areolate mildew (also known as ramularia leaf spot or grey mildew) is the most important cotton disease in Brazil, causing substantial economic loss. The pathogen was initially called *Ramularia areola* Atk., but more recent studies of the asexual reproductive structures revealed that the long conidiophores are more similar to ones in the genus *Ramulariopsis*. Diversity of the populations of areolate mildew causal agent has not been studied extensively and field observations have noted that host genetic resistance has been surpassed in certain locations. The teleomorph of the pathogen has very recently been found in Brazil, indicating a source of variability. The objective of this work was to characterize a collection of isolates obtained from the main cotton growing regions and to verify if areolate mildew is caused by one single species or by a complex of species in Brazil. Collections of symptomatic leaves were done in 13 representative locations, gathering 93 isolates. These were cultivated in PDA and studied as part of the Mycological Collection of University of Brasilia. Following DNA extraction, molecular studies were done with basis on sequencing of RPB2 region. Based on the collection studied, only one species is confirmed in Brazil, *Ramulariopsis pseudoglycines*.

Key words: Ramularia leaf spot, areolate mildew, grey mildew, *Ramularia areola*, phylogeny.

## INTRODUÇÃO

A mancha de ramulária em algodoeiro foi originalmente relatada em 1883 (Videira et al, 2016), a partir de espécies examinadas do Brasil e Paraguai sendo descritas em 1892 como *Cercospora gossypii* Speg. (Spegazzini, 1892). Posteriormente a doença foi diagnosticada em 1890 no estado do Alabama, Estados Unidos por Atkinson, que a descreveu como *Ramularia areola* G.F. Atk.. Nos anos seguintes a doença foi diagnosticada em diversos países como na Nigéria (Farquharson, 1914), Uganda (Small, 1916), Camboja (Vicens, 1919) e Austrália (Birmingham e Hamiton 1923).

Recentemente, em espécimes obtidas de algodoeiro do Brasil e Togo observou-se as estruturas conidiogênicas em culturas e em espécime de herbário que revelaram conidióforos muito longos e semelhantes à *Ramulariopsis glycines* descrita originalmente em uma amostra da *Glycine javanica*, Zâmbia. (Braun, 1998). Um clado de espécies é altamente suportado pela análise filogenética como *Ramulariopsis pseudoglycines* Videira, Crous & Braun.

No Brasil a mancha de ramulária é a doença economicamente mais importante do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em virtude da desfolha precoce. Essa doença está presente em todas as regiões produtoras de algodão no Brasil, levando a perdas em produtividade em torno de 30%, mas, dependendo das condições climáticas, pode ocasionar até 75 % de perdas (Cia, 1999, Novaes, 2011, Zandoná et al., 2012).

A mancha de ramulária é parcialmente controlada por fungicidas que exigem de 7 a 9 aplicações durante o ciclo da cultura. O controle químico afeta o meio ambiente e possui custo elevado, enquanto que a resistência genética seria preferível por reduzir o impacto ambiental e os custos de produção (Freire, 2015). Resistência parcial ou total de alguns genótipos de algodão já foi detectada em condições de campo, e tem sido explorada

comercialmente, porém a reação de resistência não é consistente em diferentes locais e sob diferentes condições ambientais (Zandoná et al., 2012).

Acredita-se que existam "estirpes de campo" conferindo variabilidade genética entre as diferentes populações de *R. areola*. Essa suspeita foi recentemente corroborada por Mehta et al. (2016), que encontraram o teleomorfo em campo e confirmaram a relação entre a forma sexual *Mycosphaerella areola* e a forma assexual. A ocorrência do estágio perfeito *M. areola* pode contribuir para o surgimento de novos patótipos do agente causal.

Os estudos sobre diversidade genética da mancha de ramulária são limitados no Brasil e no mundo. No Brasil a diversidade genética de *Ramularia areola*, foi estudada com base em 16 isolados de diferentes regiões geográficas através de marcadores ERIC-PCR e REP-PCR. Não foi encontrada evidência clara sobre a existência de linhagens genéticas do patógeno no Brasil, embora alguns isolados tenham apresentado diferenças genotípicas e fenotípicas entre si (Giroto et al., 2013). A existência de variabilidade entre os isolados do patógeno orientaria os procedimentos de melhoramento para criar novas cultivares com um espectro mais amplo de resistência contra o agente causal da mancha de ramulária.

Finalmente, há poucos meses, um amplo estudo do gênero *Ramularia* e afins indicou que o agente causal da mancha de ramulária em algodoeiro é *Ramulariopsis pseudoglycines* e não *Ramularia areola* (Videira et al., 2016). Entretanto, esta proposta foi feita citando o exame de apenas dois espécimens obtidos de algodoeiro, sendo apenas um do Brasil. Até o momento, nenhum estudo sistemático foi conduzido no Brasil para verificar a identidade dos isolados brasileiros da mancha de ramulária do algodoeiro.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização molecular dos isolados provenientes das principais regiões produtoras e verificar se a mancha de ramulária é causada por uma única espécie ou um complexo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todas as atividades relacionadas à caracterização molecular dos isolados da mancha de ramulária foram conduzidas no Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro do Departamento de Biologia Celular e no Laboratório de Micologia & Epidemiologia Botânica do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília, em Brasília, DF, Brasil.

### OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Foram realizadas coletas de folhas infectadas de cento e vinte cinco locais diferentes representativos das áreas de cerrado predominantes em cinco estados brasileiros, nas cidades Sapezal/MT, Diamantino/MT, Primavera do Leste/MT, Campo Verde/MT, Alto Garças/MT, Sinop/MT, Costa Rica/MS, Cristalina/GO, Correntina/BA, Jaborandi/BA, Luiz Eduardo Magalhães/ BA, Tasso Fragoso/MA e Balsas/MA. Foram coletadas folhas sintomáticas em plantios comerciais, priorizando uma maior distribuição geográfica dos pontos amostrais e em variadas cultivares de algodoeiro.

Estruturas do patógeno, micélio e esporos, presentes nas folhas coletadas, foram transferidas para placas de Petri com meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), pelo método de isolamento direto, sendo mantidas em temperatura ambiente.

Após o desenvolvimento das colônias em 30 dias, foi efetuado o isolamento monohifal dos isolados, com o desenvolvimento de uma colônia proveniente de apenas uma hifa. Uma réplica dos isolados foi depositada na coleção micológica do Laboratório de Micologia & Epidemiologia Botânica da Universidade de Brasília.

### EXTRAÇÃO DE DNA

A coleta do material para extração de DNA genômico foi efetuada em colônias dos isolamentos mono-hifais cultivadas em meio BDA. Com auxílio de uma alça de platina as



estruturas do fungo foram coletadas e armazenadas em microtubo de um 1,5 mL. A extração foi realizada seguindo as recomendações do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, U.S.A.).

Com auxílio do espectrofotômetro Nanovue foi determinada a concentração do DNA que foi ajustada para 25 ng/ µL. As amostras foram então armazenadas a -20 ° C para posterior utilização.

#### AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

A reação de PCR utilizou-se dos seguintes reagentes: 2,5 µL 10X PCR buffer minus Mg, 2,0 µL 10Mm dNTP mixture, 0,8 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µL Taq DNA Polymerase (5U/ul), 2,0 µL BSA, 2,0 µL DNA, 1,0 µL Primer 5F2 µL Primer 7 Cr e 13,45 água ultrapura. O DNA de todos os isolados foram amplificados e sequenciados com os iniciadores da região RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) (Tabela 1). O ciclo da PCR com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C (RPB2) por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2 % de agarose corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho e pureza das amplificações.

#### SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados por Macrogen Inc., na Coreia do Sul. As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon (Hepperle 2011). Todas as sequências foram verificadas manualmente e os nucleotídeos com posições ambíguas foram clarificados utilizando as sequências dos iniciadores em ambas as direções.

## ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon. Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. Os isolados foram previamente identificados por comparações das sequências da região RPB2 (subunidade maior da RNA polimerase) no banco de dados do GenBank.

Após a identificação inicial, isolados representativos de cada espécie (*R.gossypii* e *R.pseudoglycines*) foram adicionados ao alinhamento das sequências de todos os isolados obtidos de diferentes regiões do Brasil para análise filogenética. Essas sequências adicionais foram selecionadas a partir de Videira *et al.* (2016), e posteriormente obtidas do GenBank. As sequências foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.* 2011).

A análise de Inferência Bayesiana (IB) empregando o método da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST 2.3 (Posada & Buckley, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de IB. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). A análise de IB foi concluída com MrBayes v. 3.1.2 (Rannala & Yang, 1996). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas sequências obtidas possuem aproximadamente 700 pares de base (pb). As sequências dos isolados obtidas nesse trabalho, quando comparadas com sequências dos espécimes de *Ramulariopsis* spp. utilizando a ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide), demonstraram 100 % de identidade com a espécie *Ramulariopsis pseudoglycines*.

Embora a caracterização molecular dos isolados obtidos da mancha de ramulária (Videira et al. 2016) tenha revelado duas espécies do gênero *Ramulariopsis* spp., somente *R. pseudoglycines* foi encontrada nesse estudo. Além disso, a espécie tradicionalmente mencionada como o agente causal da mancha de ramulária (*R. gossypii*) no Brasil não foi encontrada.

## CONCLUSÃO

1. Não houve variação genotípica com base em 93 isolados, provenientes de 13 localizações geográficas em cinco estados do Brasil.
2. Todos os isolados conformaram com a espécie tipo *Ramulariopsis pseudoglycines*, baseado nas sequências depositadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRMINGHAM, W.A., HAMILTON, I.G. (1923) Diseases of the cotton plant. Agr. Gaz. New South Wales 34: 805-810, 877-886.

BRAUN U, (1998). A monograph of Cercospora, Ramularia and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). Vol. 2. IHW-Verlag, Eching, Munich, Germany.

CIA, E.; FUZZATTO, M. G.; CHIAVEGATO, E. J.; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO A. E. (1999) “Desempenho de Cultivares e Linhagens de Algodoeiro Diante da Incidência de Ramularia,” Proceedings Congresso Brasileiro de Algodão, Ribeirão Preto, Embrapa Algodão, pp. 468-470.

EHRLIC, E., WOLF, F.A. (1932) Areolate Mildew of Cotton. *Phytopathology*, 22, 229-240.

FARQUHARSON, C.O. (1914) Plant diseases in Southern Nigeria. *Ann. Rpt. Agr. Dept. So. Prov. Nigeria 1913*: 41-55.

FREIRE, E. C. Algodão no cerrado do Brasil. Cap.1, Brasília, 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Gráfica e Editora Positiva 2015. Abrapa, 2015.

GIROTTI, L.; MARANGONI, M.S.; MATOS, J.N.; GALBIERI, R.; ALMEIDA W.P.;

HEPPERLE D. (2011) DNA DRAGON 1.4.1 – DNA Sequence Contig Assembler Software. Available at: <http://www.dna-dragon.com/>

MEHTA, Y.R. (2013) Identification of Phenotypic and Genotypic Variability among the Isolates of Ramularia areola of Brazilian Cotton. *American Journal Plant Sciences*, 4, 1893-1898. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.49232>.

MEHTA, Y.R.; GALBIERI, R.; MARANGONI, M.S.; BORSATO, L.C.; RODRIGUES, H.P.; PEREIRA, J.; MEHTA, A. (2016) Mycosphaerella areola—The Teleomorph of Ramularia areola of Cotton in Brazil, and Its Epidemiological Significance. *American Journal of Plant Sciences*, 7, 1415-1422. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.710135>

NOVAES T. G.; ALMEIDA W. P.; SCHUSTER I.; MEHTA Y. R. (2011) “Herança de Resistência do Algodoeiro a Ramu- laria areola,” *Summa Phytopathologica*, Vol. 37, pp. 150-152. doi:10.1590/S0100-54052011000200012.

PINHO D.B.; FIRMINO A.L.; PEREIRA O.L.; FERREIRA JUNIOR W.G. (2012) An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122:333–345

POSADA D, BUCKLEY TR. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793–808. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150490522304>

RANNALA B, YANG Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304–311. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02338839>

SMALL, W. (1916) Annual report of the government botanist for 1914-1915. *Ann. Rpt. Dept Agr. Uganda Protect. 1914-1915: 57-70.*

SPEGAZZINI (1892) Areolate mildew of cotton. In (Some diseases of cotton). *Ala. Agr. Exp. Sta. Bul* 41: 55-58.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, ET AL. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

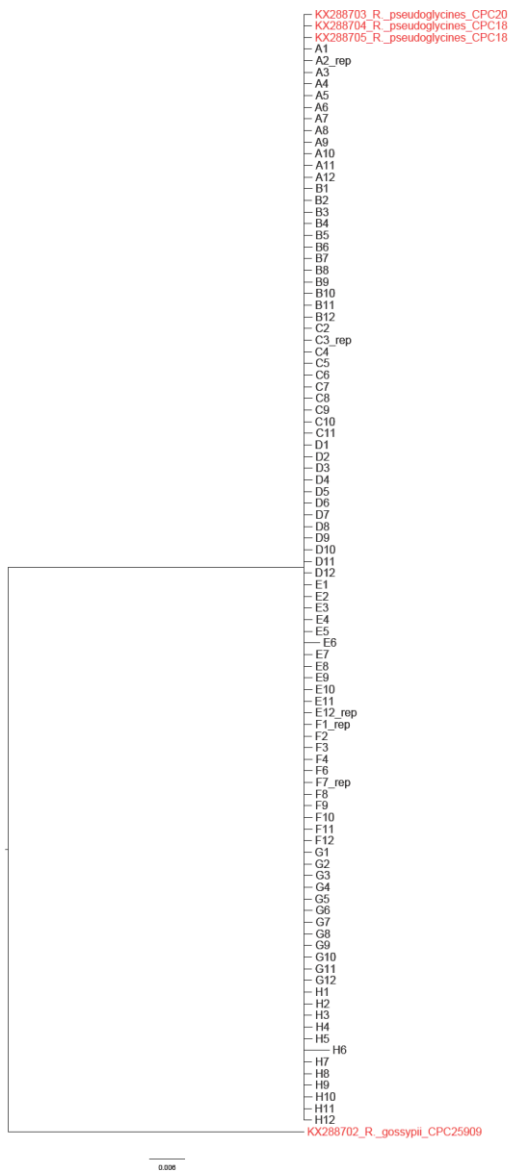
VICENS, F. (1921) Rapport sommaire sur les travaux effectués au Laboratoire de Phytopathologie de l’Indochine du Janvier 1919, auler Juliet 1921. Saigon: Imprimerie Commerciale, 19 pp. 1921. (From *Bul. Agr. Inst. Sci. Saigon* 3 307-323.

VIDEIRA S.I.R., GROENEWALD J.Z., BRAUN U., SHIN H-D, CROUS P.W. (2016) All that glitters is not Ramularia, *Studies in Mycology* (2016), doi: 10.1016/j.simyco.2016.06.001.

ZANDONÁ C.; NOVAIS T.; NUNES M. P.; ALMEIDA W. P.; SHUSTER I.; MEHTA Y. R. (2012) "Demonstration of Resistance Mechanism and Presence of Different Resistance Genes to *Ramularia areola* in Two Cotton Genotypes," *Tropical Plant Pathology*, Vol. 37, No. 3, 2012, pp. 175-178. doi:10.1590/S1982-56762012000300002.

**Tabela 1.** Lista dos iniciadores utilizados para o sequenciamento dos isolados do agente causal da mancha de ramulária.

<b>Iniciador</b>	<b>Região gênica</b>	<b>Sequência do iniciador</b>	<b>Referência</b>
5F2	RPB2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C	(SUNG <i>et al.</i> , 2007)
7Cr	RPB2	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	(LIU <i>et al.</i> , 1999)



**FIGURA 1** –Árvore filogenética obtida através da Inferência Bayesiana usando sequências da região RPB2.



# CAPÍTULO 2

Determinação de parâmetros epidemiológicos de isolados de  
*Ramulariopsis pseudoglycines*

## RESUMO

Determinação de parâmetros epidemiológicos de isolados de *Ramulariopsis pseudoglycines*

Na cultura do algodoeiro acometem diversas pragas e doenças que limitam a produtividade e qualidade do produto final. Uma das doenças de maior importância é a Mancha de ramulária, doença que provoca desfolha precoce do algodoeiro, reduzindo a produção de fibra. O controle químico tem se mostrado ineficiente e de alto custo, cerca de 7 a 9 aplicações de fungicidas são realizadas para o controle da Mancha de ramulária. Segundo Camargo (2011), o uso de cultivares resistentes é uma alternativa sustentável e de baixo impacto ambiental no manejo da doença. Atualmente existem cultivares com diferentes níveis de resistência parcial, mas o conhecimento das características das populações do patógeno em co-evolução com esses materiais é escasso. O objetivo do trabalho foi avaliar a parâmetros epidemiológicos de cinco isolados do patógeno, representativos dos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia e Maranhão, inoculados na casa de vegetação. Incidência, severidade, período de latência e período de incubação foram avaliados em quatro cultivares comerciais (FM 975 WS, TMG 47 B2RF, DP 1648 B2RF e BRS 372). Nas avaliações da cultivar suscetível (FM 975 WS) os isolados de Costa Rica/MS e Sapezal/MT apresentaram maiores áreas abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e menores períodos de incubação que em BRS 372 WS. Todos os isolados causaram sintomas na cultivar com resistência parcial, BRS 372, sem diferenças significativas na AACPD. Nenhum isolado causou sintomas nas cvs. TMG 47B2RF ou DP 1648B2RF.

Palavras-chave: mancha de ramulária, *Ramularia areola*, epidemiologia.

## ABSTRACT

### Determination of epidemiological parameters of isolates of *Ramulariopsis pseudoglycines*

Several pests and diseases occur in the cotton crop limiting yield and the produce final quality. One of the most important diseases in cotton is ramularia leaf spot, which causes premature defoliation and reduces production of fiber. Chemical control has been relatively inefficient and very costly, demanding 7 to 9 fungicide sprays per season. Use of resistant cultivars for disease management is favored, due to its sustainability and low environmental impact. Currently, several cultivars with different levels of partial resistance are available, but knowledge of the characteristics of the pathogen populations in co-evolution with these resistant materials is scarce. This study is aimed to evaluate the epidemiological parameters of five representative pathogen strains from the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia and Maranhão in greenhouse conditions. Disease incidence, disease severity, period of incubation and latent period were observed in four commercial cultivars (FM 975 WS, TMG 47 B2RF, DP 1648 B2RF, and BRS 372). In the susceptible cultivar (FM 975 WS), strains from Costa Rica/MS and Sapezal/MT showed higher areas under disease progress curves (AUDPC) and shorter incubation periods when compared to the partial resistant cultivar BRS 372. Symptoms of all strains were observed in the partial resistant cv. BRS 372 WS without significant differences in the AUDPC. No symptoms were observed in cvs. TMG 47B2RF or DP 1648B2RF.

Key words: Ramularia leaf spot, grey mildew, areolate mildew, *Ramularia areola*, epidemiology.

## INTRODUÇÃO

A incidência de doenças na cultura do algodoeiro (*Gossipum hirsutum* L.) tem restringido o aumento em produtividade em todas as regiões produtoras no Brasil (Freire, 2011). Dentre elas a mancha de Ramulária, provocada pelo fungo *Ramulariopsis pseudoglycines* Videira, Crous & Braun (= *Ramularia areola*), é a principal doença foliar do algodoeiro do Brasil (Mehta et al., 2016). A doença foi considerada secundária até a safra de 1998, incidindo no final do ciclo da cultura. Entretanto com a expansão das áreas cultivadas para o Cerrado, o aumento da área cultivada e a introdução de novas cultivares provenientes de países onde a doença não é importante, epidemias de mancha de ramulária passaram a manifestar mais precocemente, aumentando o número de ciclos da doença e causando danos elevados, incluindo desfolha prematura, e conseqüentemente, a redução do potencial produtivo (Suassuna *et al.*, 2006; Chitarra, 2008). Juliatti & Politzel (2003), Cassetari Neto & Machado (2006) e Iamamoto (2003) indicaram que a introdução de genótipos de algodão de origem australiana e americana, levou ao agravamento das epidemias, pois esses materiais se revelaram altamente susceptíveis.

Notadamente, muito pouco é conhecido sobre a virulência e a agressividade (*sensu* Andrivon, 1993) dos isolados nacionais de *R. pseudoglycines*, informação básica para orientar o melhoramento e a seleção de genótipos resistentes de algodão. Diferenças de agressividade e virulência entre populações do patógeno de diferentes regiões quanto aos parâmetros monocíclicos podem ter efeitos consideráveis na epidemiologia da Mancha de ramulária. Por exemplo, diferenças aparentemente pequenas na duração do período de latência (“p”, *sensu* Vanderplank, 1963) podem se revelar importantíssimas para a quantidade final de doença em doenças policíclicas (Fry, 1982).

A variabilidade entre 23 isolados de *R. pseudoglycines* provenientes de regiões geográficas diferentes foi estudada por Pezenti et al., (2013), utilizando três genótipos de

algodoeiro sob condição controlada. Esses autores demonstraram que os três genótipos, dois resistentes e um suscetível a mancha de ramulária, foram úteis para distinguir a variabilidade fenotípica entre alguns isolados.

De modo geral, a utilização de variedades resistentes é uma excelente alternativa de manejo, devido a sua alta eficiência e baixo impacto ambiental (Camargo, 2011). Entretanto, até agora, cultivares resistentes a diferentes "estirpes de campo" de *R. pseudoglycines* ainda não estão disponíveis, pois observa-se que a reação de resistência das cultivares se revela inconsistente sob condições de campo (Cia *et al.*, 2009). As razões para essa observada inconsistência podem ser parcialmente explicadas por putativas diferenças entre os isolados do patógeno predominantes em cada região. Sabe-se que o entendimento dos mecanismos das fontes de resistência e o conhecimento das populações do patógeno em co-evolução com o hospedeiro são fundamentais para que programas de melhoramento desenvolvam cultivares resistência durável.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em vasos, em condições de estufa, no período de julho a dezembro de 2016, na Estação Experimental da Biologia, da Universidade de Brasília, Brasília, DF. Foram semeadas quatro cultivares de algodoeiro com diferentes reações à mancha de ramulária, FM 975 WS (Bayer), DP 1648 B2RF (Monsanto), TMG 47 B2 (Tropical Melhoramento & Genética), BRS 372 (Embrapa), sendo o primeiro relatado como suscetível à mancha de ramulária, e os demais com resistência parcial. Os tratamentos constituíam de cinco isolados de diferentes regiões produtoras de algodão, com grande variação geográfica, e de uma testemunha sem inoculação. Foram selecionados cinco isolados da coleção de *R. pseudoglycines* da UnB, correspondente dos municípios de Balsas/MA, Correntina/BA, Cristalina/GO, Costa Rica/MS e Sapezal/MT. O experimento foi conduzido

em delineamento de parcelas subdivididas em esquema fatorial, de isolados e cultivares com quatro repetições. A parcela experimental foi representada por seis plantas distribuídas em três vasos.

## ÉPOCA E CONDIÇÕES GERAIS DO EXPERIMENTO

Plantas das cultivares selecionadas foram semeadas em bandejas de isopor com substrato *Plantmax*, 15 dias após foram transplantados para vasos de cinco litros em terra de barranco. Na análise química de solo o pH em água 5,2, os teores de P, K, Mn, Cu, B, S, Fe e Zn eram de 0,8; 16; 2,1; 1,1; 0,02; 4; 12,4 e 0,02 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente, os teores de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> e H+Al de 0,5; 0,01; 0,0 e 1,85 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>. Foi realizada correção do solo com calcário calcítico e adubações do formulado químico NPK 4 14 8 durante o ciclo da cultura, 20, 40 e 60 dias após a emergência 10 g por vaso em cada aplicação. Também foi adicionado aos 40 e 60 dias da emergência ureia na mesma dose sob a superfície do solo. Foram necessárias cinco aplicações do inseticida Abamectina na dose de 100 mL/100L de água, para controle de ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) que incidia sobre as plantas.

As mudas foram semeadas em 29 de julho de 2016 em bandejas de isopor, e as baixas temperaturas prevalentes na região de Brasília até agosto de 2016 prescindiram a necessidade de intervir com regulador de crescimento, prática comum realizada em campo nas fases vegetativas da cultura.

## PRODUÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram multiplicados e cultivados em vinte placas de Petri com meio BDA (Batata, Dextrose, Agar). Colônias dos isolados de *R.pseudoglycines* com 30 dias de cultivo sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h foram raspadas após adição de água às placas,

com auxílio de pincel, filtradas em gaze e coletadas em béquer de 500 ml. A suspensão de conídios foi calibrada para  $5 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup> com emprego de medida em câmara de Newbauer.

A suspensão de conídios foi pulverizada através de pulverizador de compressão manual, direcionando para a face abaxial das folhas do algodoeiro. A inoculação foi realizada por três vezes nos estádios fenológicos V4, B3 e F1 (Marur & Ruano, 2003) respectivamente aos 45, 65 e 85 dias após a semeadura, ao ponto de escorrimento. Para criar condições ideais para o desenvolvimento do patógeno realizou-se uma câmara úmida após as inoculações onde as plantas mantiveram-se encobertas por 72h sob umidade de 80% e temperatura média de 27°C. Ao final de cada inoculação foi demarcado o nó superior de cada planta.

#### AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realizar as avaliações, fotografias foram coletadas das folhas com sintomas, observando-as em oito avaliações 45, 66, 74, 84, 93, 99, 113 e 127 dias após a emergência. Transferiu-se as fotografias de resolução 300 dpi para um microcomputador, em seguida a severidade foi estimada por meio do software QUANT (Vale *et al.*, 2003). Através de porcentagens de área com sintomas foi estimada a severidade da doença nas folhas avaliadas.

Incidência e número de lesões foram quantificados a partir da identificação e contagem dos sintomas nas folhas. Com isso foi anotado a época de aparecimento dos primeiros sintomas de “mancha azul” identificando o período de incubação após a primeira inoculação.

Os dados de AACPD (área abaixo da curva de progresso de severidade) e AACPI (área abaixo da curva de progresso de incidência) (Shaner & Finney, 1977; Madden *et al.*, 2007). foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de médias. As estimativas das taxas de progresso da doença ( $r$ ) entre os

tratamentos foram comparadas por meio do intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Campbell e Madden, 1990). O software Sisvar, versão 5.6, foi utilizado para as análises (Ferreira, 2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis qualitativas foram estudadas na análise pelo teste de Tukey (Tabela 1). Os resultados demonstraram que não houve interação entre isolados e cultivares, porém houve diferenças significativas quando avaliados individualmente isolados e cultivares ao nível de 5 % de probabilidade. A testemunha não inoculada evidenciou a ausência de inóculo e de dispersão de esporos na casa de vegetação.

Os isolados de Sapezal/MT (UnB-36) e Costa Rica/MS (UnB-69), inoculados na cultivar FM 975 WS, obtiveram o menor período de incubação, causando sintomas de clorose internerval (mancha azul) aos 79 dias após a semeadura (DAS) ou 34 dias após a primeira inoculação. Enquanto os demais isolados os sintomas foram observados com 84 DAS ou 39 dias após a primeira inoculação. Quando avaliado a Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) o isolado de Costa Rica/MS (UNB-69) obteve o maior índice médio 200,4, seguido do isolado de Sapezal/MT (UnB-36) 191, de Correntina/BA (UnB-39) 128, Balsas/MA (UnB-52) 105,4 e Cristalina/GO (UnB-05) 77,1.

O período de latência foi observado aos 99 DAS a partir de uma observação de massa pulverulenta branca na face abaxial, apenas no isolado UnB-05 (Cristalina/GO) o período de latência ocorreu aos 113 DAS. Portanto, os isolados demonstraram características diferentes de agressividade na infecção na cultivar FM 975 WS que é descrita como suscetível a mancha de ramulária.



No isolado de Sapezal/MT (UnB-36), a partir da sexta avaliação foi observado queda das folhas com maior severidade, resultando em aparente diminuição da severidade nas leituras efetuadas nas folhas restantes na planta. A mancha de ramulária com alta severidade pode causar a desfolha total da planta, resultando em diminuição do rendimento do algodão. (Suassuna & Coutinho, 2014). De acordo com Beltrão *et al.* (2011), a abscisão foliar ocorre devido a mecanismos de defesa de plantas contra fungos fitopatogênicos.

Na avaliação de incidência foram avaliados três padrões de sintomas, mancha azul (Figura 4), necrose e esporulação (período de latência) (Figura 5). A mancha azul é o sintoma inicial da colonização do patógeno causando despigmentação do tecido, a necrose são lesões que levam a morte do tecido celular, de coloração marrom e os sintomas descritos como esporulações são de coloração branca com massa pulverulenta sobre o tecido.

Em função da realização de três inoculações foi observada a permanência da mancha azul até a última avaliação aos 113 DAS, as plantas foram marcadas após cada inoculação. Os sintomas aos 79 DAS foram resultantes da primeira inoculação aos 45 DAS, os sintomas de mancha azul aos 93 DAS foi resultante da segunda inoculação aos 65 DAS, sendo observados nas folhas superiores a demarcação da primeira inoculação. Os sintomas aos 113 DAS foi resultante da inoculação aos 85 DAS.

As lesões em esporulação surgiram aos 99 DAS com exceção do isolado de Cristalina/GO que apresentou esporulação apenas aos 113 DAS. O isolado com maior número médio de folhas em esporulação é de Balsas/MA e Costa Rica/MS.

Na avaliação do número de lesão (Figura 6), o isolado de Costa Rica/MS apresentou maior número de lesões nas folhas, em todas as avaliações, o isolado de Sapezal/MT obteve vantagem nas aplicações aos 93 e 99 DAS e o isolado de Cristalina/GO teve maior número de

lesões na avaliação dos 113 DAS. Os demais isolados não demonstraram destaque no número de lesões de ramularia.

Entre as cultivares tolerantes a mancha de ramulária, as cultivares DP 1648 B2 e TMG 47 B2 não expressaram os sintomas quando inoculadas com quaisquer um dos cinco isolados testados. O desempenho destas cultivares, em relação a esta doença, foi semelhante ao observado por Ascari (2016) para as cultivares TMG 42 WS e TMG 43 WS, consideradas tolerantes à mancha ramularia no Estado de Mato Grosso.

Na cultivar BRS 372 o período de incubação (Tabela 3) necessário para ocorrência de sintomas foi de 93 DAS para os isolados de Costa Rica/MS, Correntina/BA e Balsas/MT. A análise da Área abaixo da curva de progresso da doença evidenciou a média do isolado Costa Rica/MS (UnB-4) de 19,17 seguidos dos isolados Correntina/BA (UnB-2) 17,43, Sapezal/MT (UnB-5), Balsas/MA (UnB-1) 11,87 e Cristalina/GO (UnB-3) 11,25 não houve diferença significativa entre os isolados no teste de Tukey ao nível de 5% de variância, apenas em relação a testemunha não inoculada. Apesar de expressar a doença os resultados demonstram valores da AACPD inferiores aos observados na cultivar FM 975 WS. Estes resultados confirmam a descrição da resistência parcial da cultivar BRS 372 a mancha de ramularia.

Os resultados obtidos permitem afirmar que existem diferenças de agressividade dos isolados representativos de cada estado, pois os mesmos foram submetidos às mesmas condições experimentais. Em ambiente propenso existe o alto risco potencial de superação de resistência.

Desta forma, as diferenças de severidade observadas em campo entre as várias regiões produtoras podem ser parcialmente explicadas pela presença de isolados mais agressivos nessas regiões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIVON (1993). Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology* 83:889-890.

ASCARI, J.P., MENDES, I.R.N., SILVA, V.C., ARAÚJO, D.V. (2016) Ramularia leaf spot severity and effect on cotton leaf area and yield. *Pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 46, n. 4, p. 434-441, Oct./Dec. 2016

BELTRÃO, N. E. M. et al. (2011) Ecofisiologia do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch.). In: BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. (Eds.). Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão-manso e sisal. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. p. 65-124.

CAMARGO LEA. Controle genético. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin filho A (Eds) (2011) Manual de fitopatologia, Vol. 1. Princípios e conceitos. 4. Ed. Piracicaba: ed. Ceres, p. 325-341.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.

CASSETARI NETO D.; MACHADO A.Q. (2006) Doenças do Algodoeiro: Diagnose e Controle. 2. ed., Várzea Grande, MT, UNIVAG, UFMT/FAMEV. 63p.

CHITARRA, L.G. (2008) Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro. 2. Ed. Embrapa algodão: campina grande, 84p.

CIA, E.; FUZATTO, M. G.; MARTINS, A.L.; MICHELOTTO, M. D.; ALMEIDA, W. P.; OLIVERIA, A. P. (2009) Reação de genótipos de algodoeiro à incidência da mancha de ramulária em condições naturais de infestação. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 7. 2009, Foz do Iguaçu. Anais... Campina Grande: EMBRAPA/Algodão, p.1452-1455. 1 CDROM.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciênc. agrotec. [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], pp. 109-112 . Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

FREIRE E. C. (2011) História do algodoeiro no cerrado. In: Freire EC (Eds) Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, p.23-61. Pmid:22171824.

FRY, W.E. (1982). Principles of Plant Disease Management. Academic Press.378p.;

IAMAMOTO M.M. (2003) Doenças foliares do algodoeiro. Editora Funep, 1. (Eds) 41p.

JULIATTI F.C.; POLIZEL A.C. (2003) Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira. 1. (Eds) Uberlândia, MG,UFU.142p.

MADDEN, L.V., HUGHES, G., VAN DEN BOSCHI, F. (2007) The Study of Plant Disease Epidemics. The American Phytopathological Society, St. Paul, p. 432.

MARUR, C.J., RUANO, O. (2003) Escala do Algodão, Boletim técnico IAPAR, [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/EscaledoAlgodao.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/EscaledoAlgodao.pdf).

MEHTA R.Y. (2016) Mycosphaerella areola—The Teleomorph of Ramularia areola of Cotton in Brazil, and Its Epidemiological Significance. American Journal of Plant Sciences, 2016, 7, 1415-1422.

SHANER G. & FINNEY, R.E. The Effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67: 1051-1056. 1977.

SUASSUNA, N. D. (2006) Mapeamento da resistência do algodoeiro à mancha de ramulária (*Ramularia areola*) e variabilidade do patógeno no Estado do Mato Grosso. Relatório Final. Campina Grande: Embrapa Algodão/Fundação Centro –Oeste, 2006. 13p.

VALE, F.X.R. et al. QUANT: a software plant disease severity assessment. INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch Proceedings... Christchurch New Zealand: Plant Pathology Society , 2003. p.105.

VAN DER PLANK, J.E. (1963). Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press. 349p.

**Tabela 1.** Análise de variância da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do fatorial de cultivares e isolados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	5	64761.527500	12952.305500	2.890	0.0285
CULTIVAR	1	133499.707500	133499.707500	29.785	0.0000
ISOLADOS*CULTIVAR	5	47724.760000	9544.952000	2.130	0.0864
BLOCO	3	18358.261667	6119.420556	1.365	0.2704
erro	33	147908.973333	4482.090101		
Total corrigido	47	412253.230000			
CV (%) =	103.36				
Média geral:	64.7750000		Número de observações:	48	

**Tabela 2.** Área abaixo da curva de progresso da doença causadas por cinco isolados de *Ramulariopsis pseudoglycines*, representativos de regiões distintas inoculados em dois genótipos de algodoeiro

Tratamento	AACPD			
	FM 975 WS	BRS 372	TMG 47 B2RF	DP 1648 B2RF
Testemunha	0 b	0 a	*	*
Cristalina/GO	44,18 ab	11,25 a	*	*
Balsas/MA	60,24 ab	11,87 a	*	*
Correntina/BA	72,70 ab	17,42 a	*	*
Sapezal/MT	101,75 a	12,5 a	*	*
Costa Rica/MS	109,77 a	19,17 a	*	*

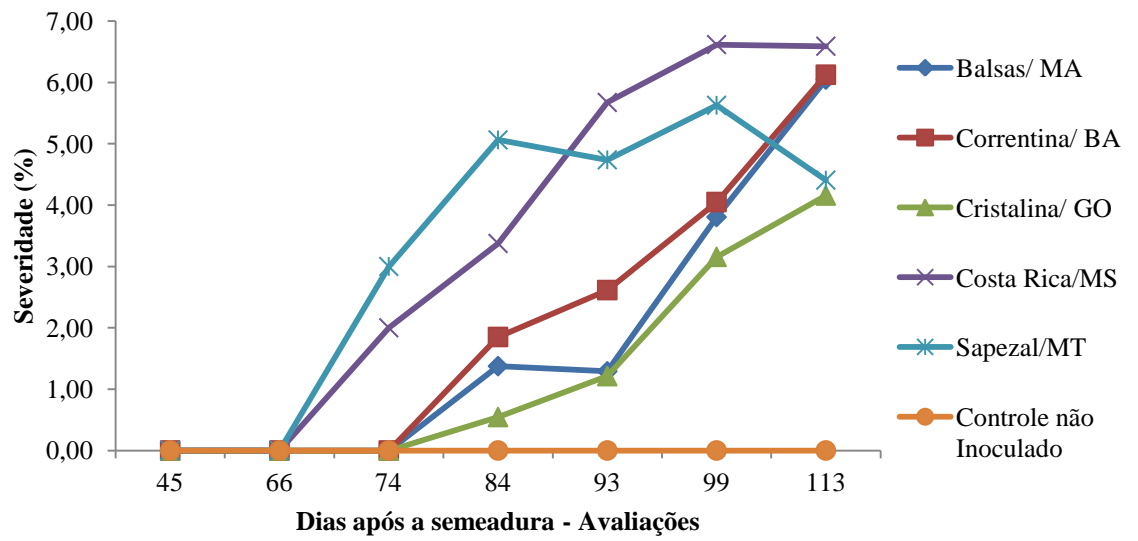
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \* Não houve infecção nestes genótipos.

**Tabela 3.** Períodos de incubação (entre inoculação e aparecimento de sintomas) de cinco isolados *Ramulariopsis pseudoglycines* representativos de regiões geográficas representativas da produção de algodão em dois genótipos de algodoeiro no.

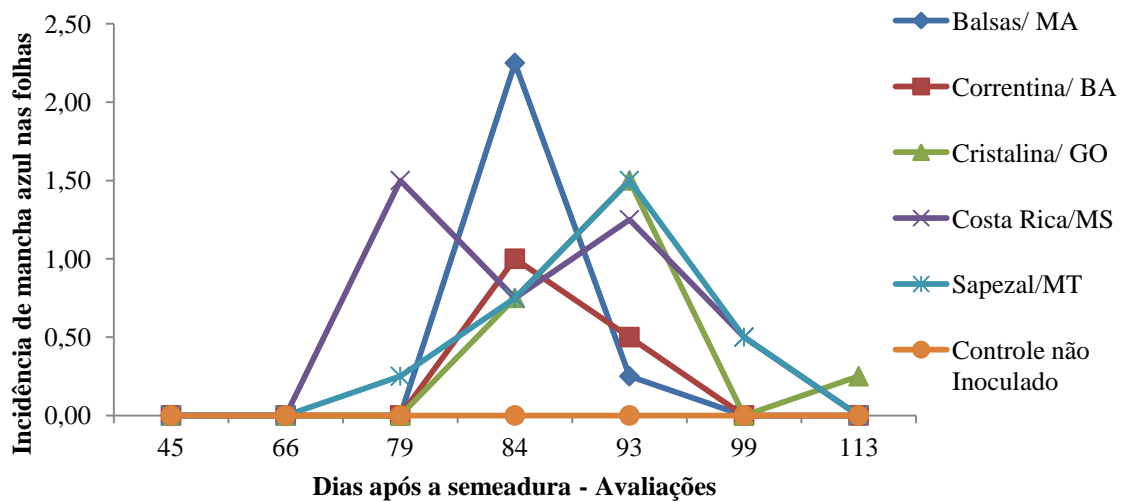
Tratamento	Período de Incubação (Dias após a inoculação)			
	FM 975 WS	BRS 372 WS	TMG 47 B2RF	DP 1648 B2RF
Testemunha	0	0	*	*
Cristalina/ GO	39	48	*	*
Correntina/ BA	39	48	*	*
Balsas/ MA	39	54	*	*
Sapezal/MT	34	48	*	*
Costa Rica/MS	34	54	*	*

\* Não houve infecção nestes genótipos

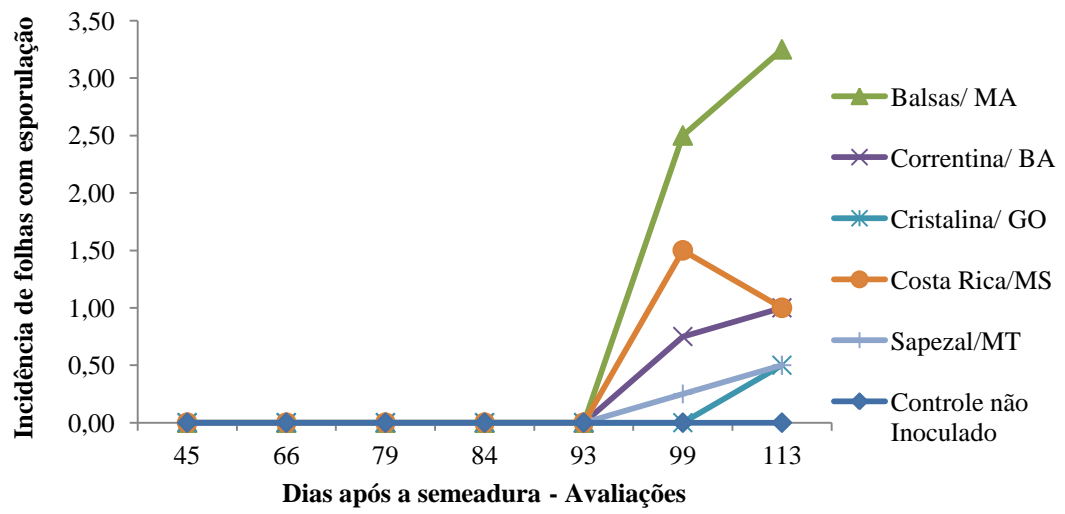




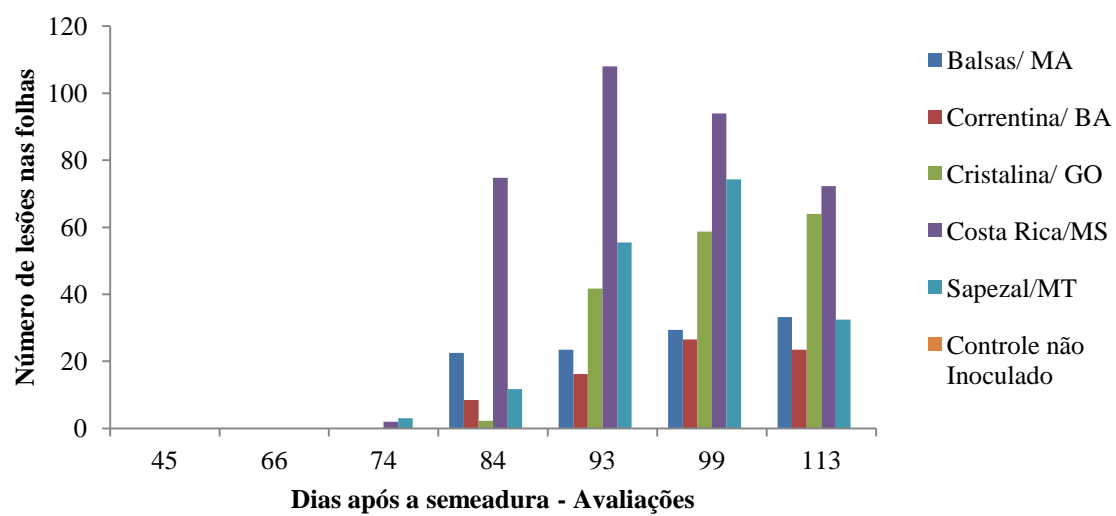
**Figura 1.** Severidade dos isolados representativos dos estados do Maranhão, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, inoculado na cultivar FM 975 WS, em função dos dias de avaliações realizadas.



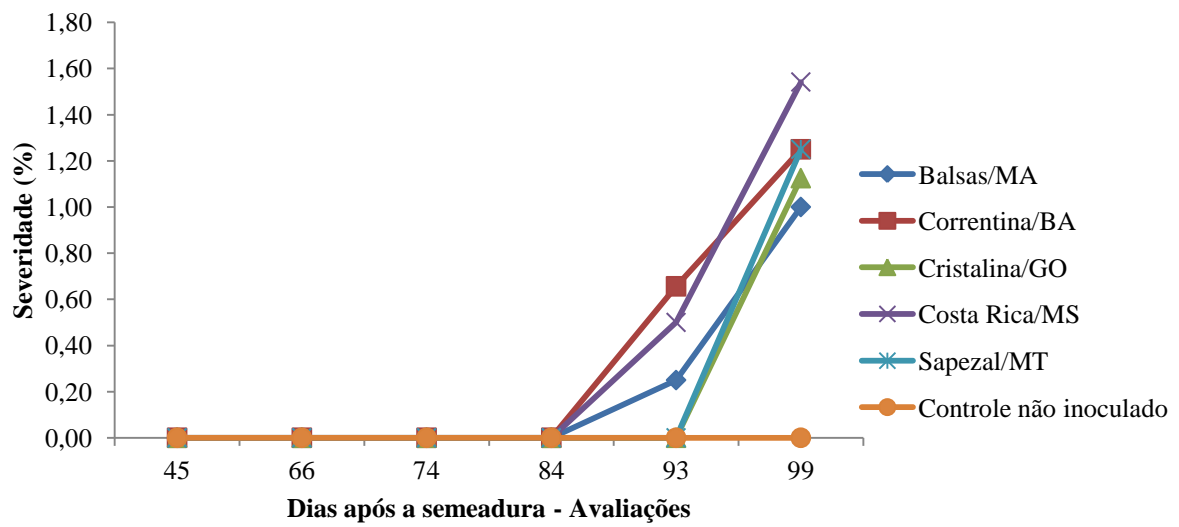
**Figura 2.** Número médio de folhas com incidência do sintoma de mancha azul, na cultivar FM 975 WS.



**Figura 3.** Número médio de folhas com incidência do sintoma de esporulação, em período de latência, na cultivar FM 975 WS.



**Figura 4.** Número médio de lesões por folha dos cinco isolados nas cultivares, na cultivar FM 975 WS.



**Figura 5.** Severidade dos isolados representativos dos estados do Maranhão, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, inoculados na cultivar BRS 372 WS, em função dos dias de avaliações realizadas.