CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, PATOGÊNICA E
SEROLÓGICA DE *COLLETOTRICHUM* DA
ANTRACNOSE E DA RAMULOSE DO ALGODOEIRO

Ana María Peralta Ottonello
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil
- Janeiro - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

P426c Peralta Ottonello, Ana Maria
Caracterização cultural, patogênica e serológica de
Colletotrichum da antracnose e da ramulose do algodoeiro.
Piracicaba, 1992.
68p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Algodão - Doença 2. Antracnose do algodoeiro - Característica 3. Fungo fitopatogênico - Resistência ao fungicida 4. Ramulose do algodoeiro - Característica I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.51

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, PATOGENICA E
SEROLÓGICA DE COLLETOTRICHUM DA
ANTRACNOSE E DA RAMULOSE DO ALGODOEIRO

Ana Maria Peralta Ottonello

Aprovada em: 5/3/92

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. José Otavio Machado Menten	ESALQ/USP
Prof. Dr. Jairo T.Mendes Abrahão	ESALQ/USP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
- Orientador -

A meu marido Carlos
e meus filhos Mariana,
Marcelo e Bernardo

DEDICO

A minha familia

MEU RECONHECIMENTO

A aqueles que tem a tocha ardente nas suas
mãos, a aqueles que transmitem excelência,
aos professores de Fitopatologia

MINHA HOMENAGEM

AGRADECIMENTOS

- Ao professor, Dr. Hiroshi Kimati, pela sua orientação, seu incentivo, e mais que tudo pela amizade e paciência que sempre soube ter.
- A Organização de Estados Americanos (OEA), pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a realização deste Mestrado.
- A Faculdade de Agronomia da Universidade da República Oriental do Uruguay e à Direção de Sanidade Vegetal do Ministério de Agricultura e Pesca do Uruguay, pela oportunidade de aperfeiçoamento proporcionada.
- Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos recebidos.
- A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela oportunidade da realização do curso.
- Ao Dr. Hashime Tokeshi, pelos ensinamentos, apoio e amizade.
- Aos colegas do Curso de Pós Graduação, pela amizade e estímulo, e em especial a Maria Edna Tenório Nunes, Marilene Tengan Iamauti, Lilian Amorim, Erna Elisabeth Bach, Maria do Carmo Fernandez Esteves, Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion e Maria Ligia de Carvalho.
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e em especial ao Sr. Pedro da Silva.
- A todos os que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMARIO

	Página
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	ix
Summary.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Sintomas causados por <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em algodoeiro.....	3
2.2. Nomenclatura e Taxonomia.....	4
2.3. Características culturais e de patogenicidade.....	7
2.4. Serologia.....	10
2.5. Sensibilidade a fungicidas de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Meios de cultura utilizados.....	16
3.2. Obtenção e preservação dos isolados.....	18
3.3. Obtenção e padronização do inóculo.....	20
3.4. Diferenciação cultural de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	21
3.4.1. Comparação do crescimento micelial de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em meio mínimo MM (PONTECORVO, 1953) e meio mínimo MPS (PUHALLA e SPIETH, 1983).....	21
3.4.2. Efeito do cloreto de trifetil tetrazólio nas características culturais de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	22
3.5. Diferenciação patogênica de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	22

3.5.1. Efeito de diferentes concentrações de inóculo de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> na produção de tombamento de plântulas do cultivar IAC 20.....	23
3.5.2. Patogenicidade dos isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em plântulas do cultivar IAC 20.....	23
3.5.3. Patogenicidade de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em ápices destacados de plantas jovens de algodão do cultivar IAC 20.....	24
3.6. Diferenciação serológica de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	25
3.6.1. Preparo do antígeno imunizante.....	25
3.6.2. Obtenção dos antissoros.....	25
3.6.3. Preparo dos antígenos para reação.....	27
3.6.4. Determinação da especificidade do antissoro.....	28
3.6.5. Titulação dos antissoros.....	28
3.6.6. Teste de dupla difusão em ágar de Outcherlony.....	29
3.6.7. Teste de imunofluorescência indireta (IFI).....	29
3.7. Sensibilidade a fungicidas de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Diferenciação cultural de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	32
4.1.1. Comparação do crescimento micelial de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , em meio mínimo MM (PONTECORVO, 1953) e meio mínimo MPS (PUHALLA & SPIETH, 1983).....	32
4.1.2. Efeito do cloreto de trifetil tetrazólio nas características culturais de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	34

4.2. Diferenciação patogênica de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	37
4.2.1. Efeito de diferentes concentrações de inóculo de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , na produção de tombamento de plântulas do cultivar IAC 20.....	37
4.2.2. Patogenicidade de 6 isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em plântulas do cultivar IAC 20 de algodão.....	40
4.2.3. Patogenicidade de <i>C.gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em ápices destacados de plantas de algodão do cultivar IAC 20.....	41
4.3. Diferenciação serológica de <i>C.gossypii</i> e <i>C.gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	42
4.3.1. Título dos antissoros.....	42
4.3.2. Especificidade dos antissoros.....	43
4.3.3. Comparação serológica pelo teste de dupla difusão em ágar.....	44
4.3.4. Comparação serológica pelo teste de imunofluorescência indireta.....	47
4.4. Sensibilidade a fungicidas de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	49
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1. Características culturais e de patogenicidade.....	52
5.2. Diferenciação serológica.....	55
5.3. Sensibilidade a fungicidas.....	56
5.4. Considerações gerais.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APENDICE.....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	PAGINA
1. Evolução do número de plantas sobreviventes, em relação a concentração de inóculo de <i>C. gossypii</i> (A ₃) e <i>C. gossypii</i> var <i>cephalosporioides</i> (R ₁₂).....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº	PAGINA
1. Isolados de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> utilizados nos diferentes experimentos.....	18
2. Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de diversos hospedeiros, utilizados nos experimentos de serologia.....	19
3. Outros isolados utilizados nos experimentos de serologia.....	20
4. Injeções e sangrias praticadas para a obtenção de antissoros dos isolados A4 e R12 de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	26
5. Nome comercial, nome técnico, formulação e concentração de ingrediente ativo (%) dos fungicidas ensaiados na sensibilidade "in vitro" de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	30
6. Crescimento micelial de seis isolados de <i>C. gossypii</i> (A1-A6) e seis de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (R7-R12) em meios mínimos MM (PONTECORVO, 1953) e MPS (PUHALLA & SPIETH, 1983).....	33
7. Efeito de diferentes doses de cloreto de trifênil tetrazolio no crescimento micelial de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	35

8. Sobrevivência de plântulas do cultivar IAC 20 de algodão, submetidas a diferentes concentrações de inóculo dos isolados A3 e R12 de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.....38
9. Efeito da inoculação de 6 isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* à concentração de 10^2 conídios/ml, no cultivar IAC 20.....41
10. Efeito da inoculação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em ápices destacados de plantas de algodão do cultivar IAC 20.....42
11. Reação de titulação do antissoro anti *C. gossypii* (A_4), com o antígeno homólogo, nas 7 extrações realizadas.....43
12. Reação de titulação do antissoro anti *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R_{12}), com o antígeno homólogo, nas 7 extrações realizadas.....44
13. Reação de antissoros anti *C. gossypii* (A_4) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R_{12}) com antígenos produzidos a partir de conídios de fungos do gênero *Colletotrichum*, pela técnica de dupla difusão em agar.....45
14. Reação de antissoros anti *C. gossypii* (A_3) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R_{12}) com antígenos produzidos a partir de micélio dos mesmos fungos, pela técnica de dupla difusão em agar.....46

15. Reação dos antissoros anti *C. gossypii* (A₄) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R₁₂) com diversos antígenos de fungos de gênero *Colletotrichum* pela técnica de imunofluorescência indireta.....48
16. Efeito de 6 fungicidas, a 1, 10 e 100 ppm sobre o crescimento de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.....50
17. Comportamento medio de 12 isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em relação ao seu crescimento em meio de cultura suplementado por 6 fungicidas em três doses.....51

CARACTERIZAÇÃO CULTURAL, PATOGÊNICA E SEROLÓGICA DE
COLLETOTRICHUM DA ANTRACNOSE E DA RAMULOSE DO ALGODOEIRO.

Autora: Ana Maria Peralta Ottonello

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Este trabalho se propôs a comparar isolados de *Colletotrichum* da antracnose e da ramulose do algodoeiro sob o ponto de vista cultural, patogênico e serológico.

Testes de avaliação de crescimento em meios mínimos ou em BDA suplementando com cloreto de trifênil tetrazólio e de sensibilidade a fungicidas mostraram que isolados da ramulose são nutricionalmente deficientes e mais sensíveis ao cloreto de trifênil tetrazólio e ao Thiram.

Testes de inoculação em sementes e em ápices destacados em algodoeiro cv. IAC 20 evidenciaram que isolados de *Colletotrichum* da ramulose são menos eficientes em causar "damping-off" do que os da antracnose mas os únicos capazes de causar necrose em ápices destacados de plantas jovens.

Testes serológicos de dupla difusão em ágar e imunofluorescência indireta feitos usando antissoro pré-preparados contra conídios dos dois fungos, revelaram menor número de antígenos miceliais em isolados da ramulose.

Em vista das diferenças detectadas e os critérios taxonômicos vigentes, sugere-se que os isolados de *Colletotrichum* da antracnose e da ramulose sejam considerados raças 1 e 2, respectivamente de *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii* existindo a possibilidade da ocorrência de outras raças com características dos dois tipos.

CULTURAL, PATHOGENIC AND SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE
ANTHRACNOSIS AND RAMULOSIS *Colletotrichum* FROM COTTON.

Author: Ana María Peralta Ottonello

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

This work was proposed to compare *Colletotrichum* isolates of anthracnosis and ramulosis from cotton under cultural, pathogenic and serological points of view.

The growing capacity test in minimal media or in PDA supplemented with tetrazolium chloride showed that ramulosis isolates are nutritionally deficient and more sensitive to triphenil tetrazolium chloride and to Thiram.

The seed and detached tip inoculation tests on the IAC 20 cotton cultivar made evident that the ramulosis *Colletotrichum* isolates are less efficient in causing damping-off than the anthracnosis isolates, but they are the only ones capable to cause necrotic symptoms on detached tips of young plants.

Serological agar double diffusion and indirect immunofluorescence tests made using antisera produced against conidia of both fungi, revealed less number of micelial antigens in ramulosis isolates.

Then, the differences detected and the taxonomic criteria in vigor could let suggest that the anthracnosis and ramulosis *Colletotrichum* isolates may be considered races 1 and 2 respectively of *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii*, existing the possibility to find other races, with both types characteristics.

1. INTRODUÇÃO

O algodão constitui a mais importante fonte de fibra textil natural, de variadíssima aplicação industrial, assim como de óleos industriais, alimentícios e medicinais; de tortas ricas em proteínas para alimentação animal, de linter para fabricação de fibras artificiais, produtos medicinais, pólvora, plásticos, etc.

O Brasil ocupa um lugar de destaque já que, de fato, foi o sexto país produtor do mundo, com uma produção de 630,6 mil toneladas de algodão em pluma no ano comercial de 1986/87, sendo que o estado do Paraná participa com 43% da produção, seguido por São Paulo com 37% da mesma (PROGNOSTICO 87/88).

Dentre as doenças que afetam esta cultura, a antracnose causada por *Glomerella gossypii* (SOUTH) Ed. (*Colletotrichum gossypii* SOUTH), está largamente distribuída em todas as regiões úmidas em que se cultiva o algodoeiro (WATKINS, 1981), constituindo no Brasil uma das mais importantes doenças da cultura, por suas manifestações patológicas (KIMATI, 1980).

A antracnose causa tanto tombamento e damping-off de pré-emergência quanto podridão de maçãs e ou diminuição da resistência das fibras, o que leva à necessidade de replantar a cultura recém instalada ou faz diminuir a quantidade e qualidade comercial do produto (BITTANCOURT, 1935 e MARSH et alii, 1950).

A ramulose ou superbrotamento, causada por *Colletotrichum gossypii* SOUTH var. *cephalosporioides* A.S. COSTA já foi uma das mais importantes doenças da cultura de algodão para o Estado de São Paulo (CIA et alii, 1977) e causou prejuízos da ordem de 30% - 70% da produção, ou mais em ataques fortes (ABRAHÃO e COSTA, 1949).

Embora a substituição de cultivares comerciais altamente suscetíveis tenha acontecido e atualmente sejam cultivadas variedades resistentes ou tolerantes ao fungo, esta doença é potencialmente grave, sendo necessário considerá-la nos trabalhos de melhoramento (CIA, 1977).

FOLLIN e MANGANO (1987) reportaram que no Paraguai a ramulose é tão capaz de produzir destruição de plântulas, quanto a antracnose, e é encontrada frequentemente em sementes produzidas em áreas contaminadas.

A ramulose causa então tombamento e, mais especificamente, superbrotamento das plantas o que prejudica o posterior desenvolvimento das mesmas.

A diferenciação dos dois organismos causais é muito difícil ou

requer um treinamento específico. As semelhanças ou diferenças entre isolados de antracnose e ramulose podem levar a propor táticas diferentes para o seu controle, seja por variações nos produtos químicos a serem usados no tratamento de sementes, por mudanças nas práticas culturais ou pela implementação de novas metodologias de reconhecimento de cada um deles.

As principais diferenças detectadas até agora são fisiológicas, de patogenicidade e alguns detalhes do hábito de crescimento (Tanaka, 1991, DUDIENAS, 1990). FOLLIN e MANGANO (1983) comparando os dois agentes patogênicos constataram diferenças que os levaram a sugerir que eles seriam diferentes e que o agente causal da ramulose pertenceria à espécie *C. gloeosporioides*".

Com o sentido de contribuir no aprofundamento do estudo das relações entre ambos, para elucidar sua taxonomia e melhorar os métodos de controle, os objetivos deste trabalho foram:

1. Pesquisar a possibilidade de diferenciar estes dois fungos em meios de cultura mínimos ou incrementados com drogas.
2. Diferenciá-los pela sua patogenicidade em plântulas e ápices meristemáticos.
3. Estudar as relações serológicas existentes entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.
4. Avaliar a sensibilidade a fungicidas "in vitro", de isolados de ambos fungos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sintomas causados por *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro

A antracnose, causada por *Colletotrichum gossypii* SOUTH, é uma doença importante e de distribuição mundial nas regiões úmidas onde se cultiva o algodoeiro, afeta a germinação das sementes, o "stand" de plantas e o desenvolvimento dos frutos, fibras e sementes (KIMATI, 1980). Todas as partes da planta são suscetíveis à antracnose. O fungo ataca as sementes e as plântulas podem apodrecer antes mesmo de emergir (BITTANCOURT, 1935).

As primeiras lesões aparecem nas plântulas com poucos dias de idade, nos cotilédones, como manchas pequenas com margens necróticas e irregulares. Com condições climáticas frias, úmidas e não favoráveis ao desenvolvimento das plântulas, a doença vai progredir, destruindo os cotilédones.

A forma mais destrutiva da antracnose ocorre no caule das plântulas que apresenta uma lesão escura ou parda em torno do colo que pode chegar a matá-las. As lesões nas maçãs ocorrem frequentemente perto do ápice e aparecem como manchas pequenas de cor púrpura escuro. A doença progride, as manchas crescem e podem cobrir uma grande superfície do fruto. Depois de penetrar na maçã, o fungo coloniza rapidamente a fibra e as sementes, podendo destruí-los. As maçãs podem então conter sementes infectadas ou infestadas pelo fungo. (ARDNT, 1946; WATKINS, 1981). As sementes são, então, uma importante forma de disseminação e sobrevivência da doença.

A ramulose ou superbrotamento, causada por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* COSTA & FRAGA Jr., foi observada pela primeira vez por COSTA e FRAGA Jr. (1937) no Estado de São Paulo, em 1936.

Daí em diante não só continua sendo considerada de grande importância esse e outros Estados do Brasil (CIA, 1982), mas também é vista como séria causa de perdas de produção onde quer que ela apareça (WATKINS, 1981).

A sua distribuição continua limitada a países da América do Sul: Brasil, Venezuela (MALAGUTTI, 1955) e Paraguai (FOLLIN e MANGANO, 1987).

Estes últimos autores afirmam que o *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pode causar na pré e posemergência destruição de sementes e plântulas, tanto quanto *C. gossypii*. Mas os prejuízos são bem

mais significativos quando a doença se manifesta em plantas novas, pois o fungo se localiza no broto apical, o que mata ou paraliza seu crescimento. Em consequência, as gemas axilares próximas são estimuladas, motivando a formação de galhos extranumerários. As reinfecções conduzem à formação de novos galhos, às vezes partindo todos de um mesmo ponto, dando à planta aparência ramalhuda. O esgotamento de reservas produzido pela formação sucessiva de galhos, resulta em detrimento da carga de capulhos, que em muitas plantas é nula (ABRAHÃO, 1952).

As plantas afetadas mostram porte baixo, ramos contorcidos e dilatados, folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas apresentam áreas cloróticas que mais tarde se tornam necróticas, deixando perfurações em forma de estrela. Nas hastes e pecíolos das folhas, se observam lesões necróticas, deprimidas ou elevadas, às vezes fendilhadas (COSTA e FRAGA Jr. 1937; ABRAHÃO, 1952). FOLLIN e MANGANO (1987) indicam que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é levado pelas sementes em frequências semelhantes a *C. gossypii* em culturas de algodão no Paraguai.

2.2. Nomenclatura e Taxonomia

A primeira descrição do fungo causador da antracnose do algodão foi feita por SOUTHWORTH (1891), com base nas suas características morfológicas. Além disso ele descreveu os sintomas nas maçãs do algodão.

Para o caso da ramulose, a identificação também baseou-se nas suas características morfológicas (COSTA & FRAGA Jr., 1939). Dois anos depois das suas primeiras observações, eles reportaram que o patógeno, do gênero *Colletotrichum*, era uma raça de *Colletotrichum gossypii*. Em relação aos sintomas, o fungo descrito causou tanto tombamento de plântulas, quanto um sintoma mais específico, de superbrotamento da planta quando ela se originava de sementes infectadas artificialmente. O fungo foi chamado *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, sugerindo a possibilidade de que ele fosse uma mutação agressiva da sua espécie.

MALAGUTTI (1955), que estudou a sintomatologia, etiologia e patogenicidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, reconhece que é possível que na Venezuela o fungo tenha se diferenciado em uma ou mais raças fisiológicas de *C. gossypii* que podem ser semelhantes, mas não necessariamente idênticas às brasileiras.

A capacidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de provocar superbrotamento, é uma característica produto de diferenças fisiológicas do organismo em relação a *C. gossypii* que não tem sido considerada na sua taxonomia.

Colletotrichum é um gênero complexo, e o seu reordenamento foi realizado por ARX (1957), que o agrupou ao redor de 11 espécies, algumas delas abrangendo centenas de espécies anteriormente descritas. Esse é o caso de *C. gloeosporioides* que passou a representar perto de 600 espécies, com as características comuns de ter conídios elípticos e medindo 12-19 x 1-6 μ m. Com base nessas características morfológicas, colocou o *C. gossypii* na espécie *C. gloeosporioides*, não tendo em conta no seu trabalho o *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Talvez a análise mais profunda do relacionamento entre a espécie e sua variedade seja o feito por FOLLIN & MANGANO (1983). O objetivo do mesmo foi verificar se o *Colletotrichum* da ramulose era uma variante de *C. gossypii*, ou se o fungo se relacionava como *C. gossypii* ao grande grupo dos *C. gloeosporioides*, de ARX (1957). Para isso compararam isolados do Paraguai e da África Central de ambos fungos nos aspectos morfológicos e de patogenicidade.

Esclarecem que a morfologia, tanto macroscópica, quanto microscópica, e além disso as exigências de temperatura, eram diferentes. O crescimento e a esporulação eram também diferentes, tendo o ponto mais destacável no fato de que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* não crescia em meio mineral estrito e apresentava marcante deficiência em biotina. O poder patogênico dos dois fungos era também muito diferente.

Os dois *Colletotrichum* podiam provocar a destruição de plântulas e lesões nas cápsulas. A agressividade era diferente, e *C. gossypii* era claramente mais agressivo, fato demonstrado pela velocidade de aparição e importância dos sintomas.

C. gossypii var. *cephalosporioides*, por outra parte, era o único capaz de atacar os meristemas e provocar o superbrotamento. As semelhanças que puderam constatar eram as comuns a todos os *Colletotrichum* de esporos elípticos de ARX (1957), agrupados sob o nome específico de *C. gloeosporioides* PENZ. A sua conclusão foi que os *Colletotrichum* da ramulose e da antracnose só poderiam ser agrupados sob a espécie *C. gloeosporioides* e que em nenhum caso agente causal da ramulose poderia ser designado como uma variedade de *C. gossypii*. Portanto, eles propõem para a ramulose o nome de *C. gloeosporioides* var. *cephalosporioides*, tendo em conta o uso feito desse último termo depois de 40 anos.

Mais recentemente, DUDIENAS (1990) caracterizou morfológica, auxanográfica e patogênicamente. *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Nos aspectos morfológicos ambos são semelhantes na maioria das suas características, exceto no tamanho dos conídios. O agente da ramulose pode apresentar conídios maiores de 16 μm , enquanto que todos os conídios do agente de antracnose são menores de 16 μm . Auxanograficamente, o *Colletotrichum* causador da ramulose foi deficiente em asparagina ou ácido aspártico, enquanto que o causador da antracnose foi auxoautotrófico para fatores de crescimento. No aspecto patogênico, em inoculações de plantas dos cultivares NU-15 e IAC-17 e maçãs destacadas do cultivar IAC-17 de algodoeiro, os fungos comportaram-se de maneira semelhante. Em maçãs destacadas do cultivar NU-15, o fungo causador de antracnose foi mais agressivo que o causador de ramulose. A autora conclui, com base nos estudos realizados, ser possível caracterizar os isolados da antracnose e da ramulose, mas todavia os dados obtidos são insuficientes para separá-los em espécies diferentes.

Quanto à fase sexuada do *Colletotrichum gossypii*, *Glomerella gossypii*, descrita por Edgerton, ULLSTRUP (1938) observa variações no comportamento em cultura de alguns isolados. Essas variações aparecem nos isolados originais, sugerindo que esses tipos culturais ocorrem na natureza. As diferenças entre subculturas estendiam-se também aos aspectos patogênicos. Uma baixa virulência correlacionava-se com baixa taxa de crescimento em meio de cultura.

FOLLIN (1969) estudando as diferentes formas de *Glomerella* e *Colletotrichum* isoladas de algodoeiro encontrou um grande número de formas *Glomerella* nos tegumentos da cápsula em geral e do ápice em particular, indicando que ali existe uma população parasita pronta para entrar à menor falha e provocar podridão. Fica neste trabalho estabelecida uma questão importante sobre se a forma *C. gossypii* resulta da evolução das formas *Glomerella* ou não, restando a necessidade de fazer um estudo do seu poder patogênico para respondê-la.

FOLLIN & MANGANO (1983) afirmam que os dois organismos, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, não possuem fase sexuada e que a forma descrita por Edgerton pertencia provavelmente a um *Colletotrichum* saprófita, dos que são achados muitas vezes sobre o algodoeiro.

2.3. Características culturais e de patogenicidade

As características culturais particulares de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* começaram a ser estudadas por Viegas (1946)¹, citado por MALAGUTI (1955). No seu trabalho ele observa que *C. gossypii* produz colônias difusas, enquanto que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* tem no meio de cultura um aspecto gelatinoso, com tendência a produzir colônias tipicamente circulares, com raios curvos.

MALAGUTTI (1955) por sua vez, não observou os raios encurvados em culturas de ramulose em meio BDA, mas sim variações morfológicas marcadas entre isolados de aspecto de colônia (mais ou menos gelatinosas), coloração das mesmas e desenvolvimento do micelio (aéreo, raso, com anéis circulares ou não). A forma de colônia era frequentemente radial e o aspecto brilhante, com pústulas escuras formadas por agrupações de conidióforos, conídios e setas, além de massas de conídios de cor rosa salmão. A disposição e o aparecimento das frutificações não era constante, podendo se dispor na parte central ou em anéis circulares nas placas de Petri. Os diâmetros medios das colônias, depois de 72 horas de incubação, foram de: 52,5; 41 e 8,15 mm a 28°C; 20-30°C, e 35°C respectivamente; não registrando nenhum crescimento a 8°C.

CARVALHO (1971) estudou o comportamento de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* a diferentes temperaturas, pH e em meios com suplementação de diferentes fontes de carbono. A melhor temperatura para crescimento do fungo foi 28°C com um pH de 6,4, embora a melhor esporulação acontecesse com pH de 5,7. Na avaliação de fontes de carbono, o melhor desenvolvimento vegetativo foi observado em substrato com dextrose e a formação de conídios acrescentada pelo conteúdo de amido. Ainda observou diferenças morfológicas bastante acentuadas (cor, forma, relevo e esporulação), entre isolados. A esporulação e o desenvolvimento vegetativo foram maiores em meio suplementado com peptona.

LIMA (1981) estudou a variação das características culturais de 104 isolados monoconidiais de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e com base em características culturais em BDA tais como tipo e cor de micelio aéreo e subaéreo, forma da colônia e esporulação, separou 5 grupos

---

¹ VIEGAS, A.P.. Alguns fungos do Brasil XII. Fungi imperfecti-Melanconiales. *Bragantia* (Brasil) 6: 5-7, 1946.

diferentes. Posteriormente estudou a variação das características culturais de 17 isolados monoconidiais pertencentes a esses grupos em 3 meios de cultura (Malte ágar de Blakslee, BDA e meio de Mathur). Em BDA e Malte ágar os isolamentos monoconidiais apresentaram variações acentuadas quanto ao tipo de micélio aéreo e pigmentação. Em meio de Mathur, não houver variações e todos os isolados se caracterizaram pela ausência de pigmentação escura e micélio aéreo, assim como pela baixa esporulação e taxa de crescimento. No caso de BDA e Malte ágar, constataram-se variações na capacidade de esporulação. Observou também uma correlação positiva entre a taxa de crescimento em meio BDA, e a patogenicidade dos isolamentos, fato que não foi reproduzido por TANAKA (1990).

FOLLIN & MANGANO (1983) avaliaram as diferenças morfológicas entre um isolado *C. gossypii* e outro de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em três meios de cultura: meio de cultura de ervilha agarizado, meio Czapeck simples, ou adicionado de extrato de levedura (3 g/l) ou hidrolisado de caseína (20 g/l) sem vitaminas. O aspecto das culturas foi bem diferente, em meio de ervilha e Czapeck. *C. gossypii* apareceu como uma cultura uniforme, de cor rosa salmão pelo grande número de conídios formados, enquanto que no meio de ervilha a ramulose originou uma cultura marrom, de aspecto geral granular. Em meio Czapeck suplementado com extrato de levedura este último fungo teve um micélio verde escuro, em relevo, com pústulas escuras cobertas de conídios salmão. Como MALAGUTTI (1955), eles não observaram os raios curvos, mas sim raios retos em meio de ervilha. Quanto ao crescimento e à esporulação, no meio de ervilha, *C. gossypii* cresceu significativamente mais depressa, e a 30°C o crescimento do *Colletotrichum* da ramulose viu-se bem diminuído. Além disso ele praticamente não cresceu sobre meio mineral ou meio mineral adicionado de aminoácidos. A adição de tiamina (100 µg/ml) e biotina (10 µg/ml) restabeleceu o crescimento e a esporulação demandou sempre a presença de biotina. Fisiologicamente então, os dois fungos foram diferentes, o da ramulose apareceu como parcialmente deficiente em tiamina e biotina, enquanto o da antracnose foi auxoautotrófico para essas vitaminas.

Trabalhando com mais isolados, DUDIENAS (1990) concluiu que auxoanográficamente, o *Colletotrichum* causador da ramulose é totalmente deficiente em asparagina e ácido aspártico enquanto que o da antracnose é auxoautotrófico para fatores de crescimento. Portanto o primeiro não cresceu em meio mínimo de PONTECORVO et alii (1953) modificado por KIMATI (1975).

Essas deficiências constatadas por DUDIENAS (1990) e FOLLIN &

MANGANO (1983) podem ser muito importantes do ponto de vista taxonômico. Segundo FRIES (1965), a auxoheterotrofia pode ser utilizada para a identificação de espécies de fungos, quando as características morfológicas não são confiáveis, mas além disso, e neste caso, pode representar uma importante ferramenta para a detecção e diferenciação dos *Colletotrichum* associados ao algodoeiro.

Quanto à patogenicidade, nos primeiros experimentos realizados por COSTA (1939), constatou-se que em vasos plantados com sementes infectadas por contato com o fungo não há praticamente diferença entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, embora no último caso o tombamento tivesse se manifestado mais rapidamente. Mais tarde o seu comportamento manifesta-se diferente, e só as plantas de sementes infectadas por ramulose exibiram na maioria dos casos o sintoma de superbrotamento. Do mesmo teor são os resultados obtidos por FOLLIN & MANGANO (1983), a morte de plântulas obtidas de sementes inoculadas artificialmente por imersão, 2 horas numa suspensão de 10^7 conídios/ml e depois secadas por 12 horas, foi significativamente mais rápida e mais forte (2,6% de plântulas sobreviventes) no caso de *C. gossypii*, que no caso de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (34,1% de plântulas sobreviventes). No caso dos ápices, a antracnose não causou nas sobreviventes nenhum sintoma, mas a ramulose provocou manchas nas folhas jovens e geralmente uma destruição da gema terminal o que levou ao desenvolvimento anárquico da planta e ao aparecimento de folhas verdadeiras ao nível do nó cotiledonário. As cápsulas mostraram também diferenças na patogenicidade dos dois fungos, quando inoculadas por pulverização com uma suspensão de 10^7 conídios/ml. Aos 7 dias da inoculação; 88,2% das inoculadas com o isolado de antracnose apresentaram sintomas enquanto só o fazia 52,9% das inoculadas com a ramulose.

DUDIENAS (1990) concordou parcialmente com esses resultados considerando que só em maçãs da variedade NU-15 de algodoeiro, o fungo causador da antracnose foi mais patogênico que o da ramulose por ser este um cultivar mais suscetível.

Para o caso específico de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, LIMA (1981) estudou a patogenicidade de 10 isolados em relação a três cultivares e sete linhagens de algodoeiro. Observou a existência de variabilidade entre os isolados testados que o levaram a concluir a provável existência de raças do patógeno.

TANAKA (1990) avaliando a patogenicidade de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em cinco genótipos de algodoeiro através

de inoculação das sementes, concordou com os resultados obtidos por FOLLIN & MANGANO (1983) em que *C. gossypii* foi mais agressivo provocando maior redução na emergência ou menor número de plântulas sobreviventes. Constatou também a existência de uma grande variação na patogenicidade dos isolados testados, que poderia levar à obtenção de resultados variáveis de acordo com a composição das misturas de isolados usadas nas inoculações.

2.4. Serologia

Desde o início deste século, as técnicas serológicas vem sendo aperfeiçoadas em diversos ramos da Biologia e da Microbiologia tendo um importante papel na identificação e classificação de microorganismos (SEELIGER, 1968).

FIGUEIREDO et alii (1977) têm a convicção de que a serologia pode ser de grande utilidade para a Micologia fitopatológica, não somente auxiliando a sistemática na separação de espécies, raças, formas e biotipos, como também no melhor entendimento das relações patógeno-hospedeiro. No entanto, sua opinião é que existe muito ainda por fazer e pesquisar tentando aprimorar a metodologia e as técnicas a serem aplicadas para a seleção de antígenos específicos. Mais recentemente, LANKOW et alii (1984) assinalam que o diagnóstico baseado na produção de anticorpos monoclonais em Fitopatologia pode servir para a determinação de espécies, patovares, *formae specialis*, e raças, o que permitiria adotar decisões de manejo nas culturas de acordo com essa identificação.

A especificidade dos anticorpos monoclonais, até pode ser usada para detectar as mudanças na população do patógeno num período de tempo. OUELLETTE & BENHAMOU (1987) na sua revisão do uso de anticorpos monoclonais para detectar moléculas de fungos patógenos de plantas explicam que no curso dos últimos anos a detecção de infecções, a diferenciação de isolados, assim como a avaliação do papel e o modo de ação de metabolitos fúngicos nas interações hospedeiro-patógeno têm sido feitas com sucesso graças à utilização de anticorpos monoclonais como forma de solucionar problemas não resolvidos pela serologia tradicional. Assim as predições realizadas por FIGUEIREDO et alii (1977) cumprem-se na atualidade, pelo levantamento das dificuldades por ele expressadas.

Muito tem sido feito durante esse período e a serologia vem assumindo uma importância crescente na Micologia fitopatológica. No caso

de existir dificuldades taxonômicas do ponto de vista morfológico, aparece como uma excelente ferramenta de pesquisa das relações entre *formae specialis*, espécies de gêneros de taxonomia confusa e raças fisiológicas (MADOSINGH, 1966; BUXTON et alii, 1961; MORTON & DUKES, 1966), usando basicamente a técnica de dupla difusão em agar. Para o caso específico do gênero *Colletotrichum*, KIMATI (1975) cita o antecedente de Hedge et alii (1968)² que tentaram diferenciar serologicamente raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e acharam fortes relações antigênicas desse fungo com *C. atramentarium*, *C. capsici*, *C. curvatum*, *C. falcatum* e *C. gloeosporioides*. No seu trabalho, KIMATI (1975) consegue diferenciar, pelo teste de dupla difusão em agar isolados de *C. graminicola* de cana-de-açúcar, milho e sorgo, o que junto com a caracterização auxanográfica e a especificidade ao hospedeiro, lhe permite sugerir a sua divisão em 3 *formae specialis*: *sacchari*, *zeae* e *sorghii*.

BAJUNGU (1979) estudou as características de patogenicidade, fisiologia e serologia de *C. gloeosporioides* f. sp. *cepae*, em dupla difusão em agar, achando diferenças entre os dois isolados de *C. gloeosporioides* de cebola, já que o antissoro reagiu unicamente com o seu antígeno homólogo.

PIZZINATTO (1981) encontrou também um bom apoio na serologia, porque o teste de dupla difusão em agar evidencia que o isolado de *C. graminicola* de trigo é diferente dos isolados de cana-de-açúcar e sorgo. Esta característica, além dos testes de patogenicidade lhe permitem sugerir a denominação de *forma specialis secalis* para isolados de *C. graminicola* de trigo, centeio e cevada.

Do ponto de vista das técnicas usadas, a imunofluorescência tem sido empregada para identificação de espécies de *Phytophthora* (BURRELL et alii, 1966, MERZ et alii, 1969), *Pythium* (WHITE, 1976), *Phoma* (HINGAND et alii, 1983) e *Eutypa* (PRICE, 1973; GENDLOFF et alii, 1983), com resultados variáveis. Essa variação vai desde uma carência total de especificidade no caso de GENDLOFF et alii, (1983) que trabalharam detectando *Eutypa armeniacae* de videira, até a diferenciação ao nível de variedade que conseguem HINGAND et alii (1983) entre *Phoma exigua* var. *exigua* e *Phoma exigua* var. *Foveata* em batata.

---

² HEDGE, R.K.; SACHCHIDANANDA J.; CHENULU V.V. e MUNJAL R.L.. Serology in the differentiation of physiologic races of *C. lindemuthianum* and determination of varietal resistance to disease. *Indian J. Exp. Biol.*, 6: 166-167 (Rev. Appl. Mycol, 48: 75), 1968.

2.5.   Sensibilidade a fungicidas de *C. gossypii* e *C. gossypii*
              var. *cephalosporioides*

De acordo com LIMA et alii (1984) o método mais eficiente para controlar a ramulose é o uso de cultivares resistentes. Os trabalhos desenvolvidos até agora mostram níveis razoáveis de resistência ou uma relativa tolerância para esta doença como é o caso do IAC 17, mas a resistência encontrada pode ser considerada como não satisfatória. É por isso que normalmente são usados outros métodos alternativos de controle, baseados por exemplo no controle da sanidade das sementes.

PIZZINATTO et alii (1988) estudaram a transmissão da ramulose por sementes de algodão, demonstrando que houve disseminação eficiente do patógeno, mesmo para a cultivar mais resistente, a partir do inóculo inicial transportado pelas sementes.

No caso de antracnose, KIMATI (1980) afirma que tanto as sementes contaminadas como as infectadas por *C. gossypii*, constituem a principal via de disseminação, pois, conforme as condições climáticas, essas sementes podem originar plântulas com tombamento. PIZZINATTO (1987) então acredita que estes dois fungos devem ser considerados dentre os mais importantes economicamente, em estudos de patologia de sementes de algodoeiro.

O tratamento químico das sementes foi experimentado há muitos anos com bons resultados para controle do tombamento. PIZZINATTO (1986) numa palestra sobre o tratamento de sementes de algodão afirma que na década de 60 iniciou-se no Brasil a realização de trabalhos científicos a respeito de tratamento químico das sementes baseados mormente na avaliação da emergência e do tombamento, mas infelizmente sem determinar claramente o grau de infecção inicial ou o(s) agente(s) patogênico(s) responsáveis.

Ponte (1967)³, citado por CIA (1977), estudou a eficiência do tratamento de sementes na redução das falhas no plantio de algodão Mocó causado por *C. gossypii*. Os fungicidas que apresentaram melhor comportamento em experimentos de campo e casa de vegetação foram: Quintozone + Thiram, Benomyl + Thiram + Chloroneb, mercuriais, Chloroneb + mercuriais, Quintozone e Carboxin.

---

³ PONTE, J.J. Eficiência do tratamento das sementes da redução das "falhas" em plantio de algodão Mocó. Turrialba, 17: (1): 6 8-70, 1967.

SATO et alii (1974) concluíram que os melhores tratamentos para o controle do tombamento foram os realizados com produtos sistêmicos do tipo Benomyl, misturas de Benomyl + Thiram + Chloroneb, e Thiram + PCNB aplicados às sementes.

Furlan et alii (1985)⁴ e Julliatti et alii (1986)^{5,6}, citados por PIZZINATTO (1986) assinalaram que no controle de *C. gossypii* destacaram-se Benomyl, Thiram, Thiram + Iprodione, Guazatine, Guazatine + Imazalil, Thiabendazol, PCNB, Prochloraz e Captan.

JULLIATTI et alii (1987) avaliaram em condições de campo e laboratório a eficiência dos fungicidas Tolclofos Metil só ou em misturas com Captan e Captafol, Captafol só ou com PCNB e PCNB aplicados às sementes. Para porcentagem de plântulas infectadas, todos os tratamentos foram superiores à testemunha, reduzindo também a recuperação de *C. gossypii*, principalmente os fungicidas Captafol + PCNB, Tolclofos Metil e Tolclofos Metil + Captafol.

PATRICIO et alii (1989) avaliaram o efeito do tratamento de sementes de algodão com os produtos ou misturas: Benomyl, Carboxin + Thiram, Iprodione + Carbendazim, Iprodione, Thiram, PCNB + Etridiazol, Imazalil, Metalaxyl + Iprodione, Guazatine e Metalaxyl, num lote de sementes com 53% de *C. gossypii*, além de outros fungos. Para germinação de sementes em laboratório, os melhores produtos foram Metalaxyl + Iprodione, Imazalil e Carboxin + Thiram. Os produtos que melhor controlaram os fungos presentes nas sementes foram Benomyl, Imazalil e Iprodione + Carbendazim. Em condições de campo, as condições climáticas não foram propícias ao tombamento e só se obteve uma tendência para melhor emergência em sementes tratadas com Carboxin + Thiram, Iprodione + Carbendazim e Thiram.

-
- ⁴ FURLAN, S.H. & MENTEN, J.O.M.. Efeito do tratamento químico na sanidade e emergência de sementes de soja e algodão. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 333, 1986.
- ⁵ JULIATTI, F.C.; HIRAI, L.T.; SALOMAO, M; SILVA, R.A. Eficiência de novas formulações fungicídicas no tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em Bandeirantes-PR. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 340, 1986 a.
- ⁶ JULIATTI, F.C.; OUCHI, S.F.; SCRANIN, O.L.; ZANARDO, J.. Efeito dos fungicidas Captafol + PCNB, PCNB + Thiram e Iprodione + Thiram no controle de fungos transmissíveis por sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). *Fitopatologia Brasileira*, 11: 339, 1986 b.

GOULART (1988) estudou a eficiência do tratamento químico às sementes de algodão no controle de fungos causadores de tombamento a nível de campo, com o cultivar IAC 17. Observou resposta ao tratamento com fungicida com destaque para a mistura Moncerem + Euparen para a avaliação do "stand" de plântulas. Para o tombamento causado por *C. gossypii* e *Rhizoctonia solani*, foram muito eficientes as misturas de Euparen + Moncerem, seguidas do Euparen (200g p.c./ 100kg de sementes) e logo depois a mistura Moncerem + Captan (200g p.c./100 kg de sementes) e Benomyl. A menor eficiência, mas sempre maior à da testemunha foi para o Euparen (300g p.c./100 kg de sementes) e a mistura Moncerem + Captan (300g p.c./100 kg de sementes).

MACHADO & SILVA (1988) avaliaram a eficiência de fungicidas no controle do tombamento de plântulas da variedade IAC 20 que continham 13% de *C. gossypii*, além de 7% de *Fusarium* e 8% de *Botryodiplodia*. Em condições de laboratório os tratamentos envolvendo Benomyl, Iprodione + Thiram, e Iprodione + Carbendazim foram os mais eficientes em reduzir o nível de patógenos. Em casa de vegetação, Benomyl, Mancozeb, Iprodione e Thiram reduziram o número de plantas com lesões em perto de 80, 78, 77 e 75% respectivamente, em relação às sementes não tratadas. Em termos de "stand" final, houve um maior valor médio do número de plantas emergidas no tratamento envolvendo Mancozeb, apesar de não ter existido diferença significativa.

CARVALHO et alii (1988) procuraram um fungicida que tivesse bom controle do tombamento de pós-emergência das mudinhas. As sementes foram tratadas com Captan, Tiofanato metílico e Benomyl em diferentes dosagens e inoculadas com $2,7 \times 10^6$ conídios/ml de *C. gossypii*. Verificou-se que somente o Benomyl a 0,2% de p.a. apresentou 100% de mudinhas saudas. O Tiofanato metílico, à mesma dose, apresentou somente 50% de plantas saudas e o Captan a 0,3% p.a., 100% de mortalidade.

Depois das primeiras observações feitas para o combate à ramulose do algodoeiro por ABRAHÃO (1961), que recomenda pulverizar preventivamente a folhagem das plantas adjacentes aos focos com Dithane a 0,25%, Manzate a 0,2%, Cupravit a 0,35% ou Cobre Sandoz a 0,35%; ARAUJO et alii (1978) recomendam o uso de Cúpricos, Maneb e Captafol para evitar a dispersão da doença.

Em outros países o tratamento de sementes é reconhecido como necessário para algodão. FOLLIN & MANGANO (1987), num trabalho sobre a desinfecção de sementes no Paraguai, destacam que 5 anos de resultados na desinfecção de sementes de algodão permitiram substituir o organo-mercurial usado até esse momento por produtos orgânicos de síntese como o Captan, Thiram, Carboxin, Metil Tiofanato, PCNB, Carbendazim,

Metsulfovac, Tolclophos metil e Metalaxyl, sós ou em misturas. A recomendação final que eles fazem, tendo em conta os custos e os rendimentos, é a de utilizar um produto como o Captan para todo o grupo de patógenos associados às sementes, entre os quais se acham *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba (S.P.)

3.1. Meios de cultura utilizados

a) Meio de BDA (batata-dextrose-ágar)

Batata	-	200 g
Dextrose	-	20 g
Ágar	-	20 g
Água destilada	-	1000 ml

b) Meio de aveia

Farinha de aveia	-	40 g
Ágar	-	12 g
Água destilada	-	1000 ml

c) Meio mínimo-MM (PONTECORVO et alii, 1953)

Glucose	-	10 g
NaNO ₃	-	6 g
KCl	-	0,52 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	0,52 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	10 mg
KH ₂ PO ₄	-	3,8 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	1 mg
Ágar Difco	-	15 g
Água destilada	-	1000 ml

d) Meio mínimo-MPS (PUHALLA e SPIETH, 1983, modificado)

Sucrose	-	30 g
NaNO ₃	-	2 g
KH ₂ PO ₄	-	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	0,5 g
KCl	-	0,5 g
Solução de micronutrientes	-	0,2 ml
Ágar Difco	-	20 g
Água destilada	-	1000 ml

Solução de micronutrientes

Acido citrico	-	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	4,75 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	250 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	-	50 mg
H ₃ BO ₃	-	50 mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	50 mg

Estas substâncias foram dissolvidas em 95 ml de água destilada e a solução conservada sob refrigeração.

e) Meio BDA adicionado com cloreto de trifenil tetrazólio

O meio BDA foi adicionado com: 0,005, 0,02 e 0,04% de cloreto de trifenil tetrazolio.

O cloreto de trifenil tetrazólio foi adicionado ao meio de cultura fundente depois da esterilização, calculando o volume necessário partindo de uma solução estoque a 1% em água estéril.

f) Meios de cultura com fungicidas

A metodologia de preparo dos meios de cultura com fungicida foi semelhante à utilizada por EDGINGTON et alii (1971), modificada por MENTEN et alii (1976), a qual consiste em dissolver os fungicidas em quantidades de produto ativo previamente calculadas em 5 ml de acetona, e a seguir completar o volume com água destilada estéril para 100 ml.

A partir dessa solução estoque obtiveram-se através de diluições em série, as concentrações desejadas, adicionando 1 ml das respectivas

suspensões em 99 ml de meio de cultura BDA fundente (45 -50°C).

No presente experimento, no entanto, os fungicidas foram dissolvidos em água destilada estéril e o volume preparado de solução estoque foi de 20 ml.

A solução estoque foi conservada na geladeira (4-5°C) coberta com folha de alumínio para preservá-la da luz.

3.2. Obtenção e preservação dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum gossypii* e sua var. *cephalosporioides* empregados neste trabalho foram fornecidos pela Eng^a. Agr^a. Christina Dudienas, devidamente caracterizados como causadores de antracnose ou ramulose; uma relação dos mesmos aparece na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizados nos diferentes experimentos.

Isolado	Identificação	Orgão de isolamento	procedência
A1	<i>C. gossypii</i> (Antracnose)	Maçãs	Uberaba-MG
A2	"	Sementes	Pirapozinho-SP
A3	"	Sementes	Leme-SP
A4	"	Ramos	Conchal-SP
A5	"	Maçãs	Mococa-SP
A6	"	Maçãs	Sta. Cruz do Rio Pardo-SP
R7	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (Ramulose)	Ramos	Capinópolis-MG
R8	"	Ramos	Canápolis-MG
R9	"	Ramos	Ituverava-SP
R10	"	Ramos	Ituverava-SP
R11	"	Ramos	Ituverava-SP
R12	"	Ramos	Ituverava-SP

Outros isolados de fungos do gênero *Colletotrichum*, utilizados nos experimentos de serologia, foram fornecidos pela Eng^a. Agr^a. Maria Isabel Fancelli (isolados de jiló e mamão) e pelo Eng. Agr. Agnelo Vitti (isolados de pêra, uva, maçã e morango) ou obtidos de lesões típicas de frutos (isolados de banana, berinjela e pimentão), através de transferência das frutificações para placas de Petri contendo BDA.

As placas foram incubadas a temperatura ambiente (28-30°C) e após o aparecimento de crescimento micelial, e frutificações procedeu-se à identificação do patógeno, e sua repicagem a nova placa de Petri com BDA, até verificar a ausência de contaminações. Os isolados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de diversos hospedeiros, utilizados nos experimentos de serologia.

Isolado	Espécie de <i>Colletotrichum</i>	Hospedeiro	Procedência
CJI	<i>C. gloeosporioides</i>	Jiló	1
CMAM	<i>C. gloeosporioides</i>	Mamão	2
CPE	<i>C. gloeosporioides</i>	Pêra	2
CUV	<i>C. gloeosporioides</i>	Uva	2
CMAC	<i>C. gloeosporioides</i>	Maçã	2
CMO	<i>C. acutatum</i>	Morango	2
CBA	<i>C. musae</i>	Banana	3
CBE	<i>C. gloeosporioides</i>	Berinjela	3
CPI	<i>C. gloeosporioides</i>	Pimentão	3

- 1: Cedido pela Eng^a. Agr^a M.S. Maria Isabel Fancelli
- 2: Cedido pelo Eng^o. Agr^o. Agnelo Vitti
- 3: Piracicaba - SP

Nos experimentos de serologia também foram utilizados isolados de outros gêneros de fungos, que são listados na tabela 3. Os mesmos foram obtidos por isolamento em meio BDA e incubados a temperatura ambiente.

Tabela 3. Outros isolados utilizados nos experimentos de serologia.

ISOLADO	Patógeno	HOSPEDEIRO
PEX	<i>Penicillium expansum</i>	Maçã
PDI	<i>Penicillium digitatum</i>	Citrus
FUS	<i>Fusarium</i> spp.	Cebola
BOC	<i>Botrytis allii</i>	Cebola
RZS	<i>Rhizoctonia solani</i>	Batata
ASP	<i>Aspergillus</i> spp.	Sementes de Algodão
PEA	<i>Penicillium</i> spp.	Sementes de Algodão

Os isolados foram conservados em água pelo método de CASTELLANI (1939), modificado por FIGUEIREDO (1967). O mesmo consistiu na transferência de discos de 4,5 mm de diâmetro de culturas em crescimento ativo em meio BDA para vidros de tipo penicilina ou tubos de tampa rosqueada, contendo 3-4 ml de água destilada estéril. Depois de devidamente tampados e vedados com filme transparente de PVC os mesmos foram mantidos na geladeira (5°C).

3.3. Obtenção e padronização do inóculo

Para os experimentos de inoculação de sementes e plantas de algodoeiro, as suspensões de conídios foram obtidas adicionando 15 ml de água destilada esterilizada a cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo as culturas desenvolvidas por 10 dias a temperatura ambiente (28-30°C) em meio de aveia. Uma alça foi passada com suavidade pela superfície das colônias com o objetivo de facilitar a liberação de conídios. Essas suspensões foram ajustadas às concentrações de uso por contagens em hemocitometro e diluição em água destilada esterilizada.

3.4. Diferenciação morfológica de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

A diferenciação morfológica de ambos os *Colletotrichum* baseou-se no seu comportamento diante de dois meios mínimos e de meio de cultura adicionado de cloreto de trifênil tetrazolio.

Em todos os casos os isolados foram repicados por duas vezes sucessivas para meio mínimo MM para ter certeza de não existir contaminação com o meio original.

Após esse tratamento, e quando as colônias tinham 7 dias de idade em incubação a 28°C, foram retirados discos de 0,45 mm de diâmetro dos bordos das colônias, os quais uma vez transferidos para o centro de placas de Petri com meio de cultura correspondente tiveram que ser incubados a temperatura ambiente (28-30°C) e sob luz contínua por um período de mais de 96 horas.

3.4.1. Comparação do crescimento micelial de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em meio mínimo MM (PONTECORVO, 1953) e meio mínimo MPS (PUHALLA e SPIETH, 1983)

Foram comparadas as características culturais dos 6 isolados de antracnose (A1-A6) e 6 de ramulose (R7-R12) que aparecem na Tabela 1, em meio mínimo MM (PONTECORVO, 1953) e meio mínimo MPS (PUHALLA e SPIETH, 1983)

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento realizado com três repetições.

A avaliação do ensaio foi realizada, após 48 e 96 horas de incubação, a 28-30°C sob luz contínua, através do crescimento linear, medindo-se os dois diâmetros das colônias, perpendiculares entre si, com o auxílio de régua milimetrada.

3.4.2. Efeito do cloreto de trifenil tetrazólio nas características culturais de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Esse efeito foi avaliado em três concentrações: 0,005; 0,02 e 0,04% em meio BDA.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas com 3 repetições por tratamento.

A avaliação realizou-se depois de 96 horas de incubação utilizando o mesmo parâmetro que em 3.4.1, e considerando também a forma, cor e aspecto da colônia.

3.5. Diferenciação patogênica de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Esta diferenciação baseou-se na patogenicidade de isolados caracterizados de antracnose e ramulose no cultivar IAC 20 de algodão. Sementes dessa variedade foram deslintadas com ácido sulfúrico comercial concentrado (96-98%), numa proporção de 200 ml para 1 kg de sementes.

As sementes em contato com o ácido foram revolvidas com bastão de vidro por 5 minutos e a seguir, lavadas várias vezes em água corrente e postas a secar.

Para a obtenção e padronização do inóculo procedeu-se de acordo com o descrito em 3.3.

Todas as inoculações às sementes foram feitas através de imersão nas suspensões de conídios correspondentes (FOLLIN & MANGANO, 1983) por 2 horas e, posteriormente, deixadas secar por 16 horas a temperatura ambiente.

No caso das plantas testemunha as sementes foram colocadas em água destilada seguindo o mesmo procedimento descrito para a inoculação.

Posteriormente foi efetuada a semeadura em vasos contendo solo estéril e os mesmos mantidos em condições de casa de vegetação, sem controle de umidade e temperatura, nos meses de fevereiro-março de 1989.

3.5.1. Efeito de diferentes concentrações de inóculo
de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* na
produção de tombamento de plântulas do cultivar IAC 20

Neste experimento foi avaliado o efeito de 4 diferentes concentrações de inóculo (10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/ml) aplicadas às sementes, para o caso dos isolados A3 e R12, de antracnose e ramulose respectivamente.

As sementes inoculadas e uma testemunha foram semeadas num delineamento estatístico fatorial, inteiramente casualizado, $2 \times 5 \times 4$ (2 isolados, 5 concentrações de inóculo e quatro repetições; cada uma sendo representada por um vaso com 10 sementes, totalizando 40 sementes para cada tratamento).

Na avaliação, realizada 15 dias após a semeadura, foram contadas as plantas sobreviventes.

3.5.2. Patogenicidade dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii*
var. *cephalosporioides* em plântulas do cultivar IAC 20 de
algodão

Este estudo foi realizado visando estudar as diferenças em patogenicidade de 3 isolados de antracnose (A1, A3 e A4) e 3 de ramulose (R7, R10 e R12) submetidos à mesma concentração de inóculo (10^2 conídios/ml).

A inoculação e manipulação das sementes ajustou-se ao descrito em 3.3 e 3.5.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, perfazendo 7 tratamentos (testemunha não inoculada e 6 isolados).

A avaliação foi feita 15 dias após a semeadura, sendo contabilizado o número de plantas sobreviventes.

3.5.3. Patogenicidade de *C. gossypii* e *C. gossypii*
var. *cephalosporioides* em ápices destacados de plantas
jovens de algodão do cultivar IAC 20

A caracterização patogênica dos isolados A1, A2, A3 e A4 de antracnose e dos R7, R9, R10 e R12 de ramulose foi feita utilizando-se o método de inoculação de ápices destacados de plantas de algodão de 45 dias de idade desde a semeadura.

Os ápices de 8 cm de comprimento foram destacados das plantas no fim da tarde, sendo cortados enquanto se achavam submersos em água, e imediatamente transportados para o laboratório.

Ali foram colocados aos pares em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com um chumaço de algodão úmido na base, após a retirada das suas folhas, exceto as duas menores, mais próximas do ápice.

As placas continham uma camada dupla de papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Como inóculo, foram utilizadas suspensões de 10^5 conídios/ml preparadas como descrito em 3.3. Os ápices destacados foram inoculados por pulverização com pulverizador manual (Unispray 2000). Como testemunha utilizaram-se ápices pulverizados com água destilada estéril. A seguir as placas foram incubadas em condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III) com temperatura de 20-25°C sob condições de luz contínua. Periodicamente foi controlado o nível de umidade no papel de filtro da base da placa, adicionando água destilada quando fosse necessário.

Para cada tratamento foram feitas 10 repetições (5 placas com 2 ápices cada uma) e a avaliação foi feita aos 7 e 10 dias após a inoculação, através de contagem dos meristemas apicais mortos.

3.6. Diferenciação serológica de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Para a diferenciação serológica de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, foi produzido antissoro para os isolados A4 de antracnose e R12 de ramulose.

3.6.1. Preparo do antígeno imunizante

O antígeno de imunização consistia em suspensões de 5×10^7 conídios/ml de cada isolado, obtidas de culturas de 10 dias de idade em meio de aveia. A suspensão foi preparada adicionando 15 ml de solução salina (NaCl 0.85%) por placa de cultura e submetendo os conídios a 2 lavagens sucessivas por centrifugação (Centrífuga SORVALL SS4) a 10.000 rpm por 10 minutos e resuspensão em solução salina. As suspensões de conídios foram preservadas no congelador.

3.6.2. Obtenção dos antissoros

Os antígenos foram injetados em coelhos da raça Nova Zelândia de 3 kg de peso aproximadamente. Pouco antes da injeção aos coelhos, as suspensões de esporos foram misturadas em volumes iguais com adjuvante completo de Freund (DIFCO) para aplicações intramusculares.

As aplicações foram feitas por via intramuscular na coxa ou intravenosa, na veia marginal da orelha, de acordo com o protocolo mostrado na tabela 4, onde também aparecem as sangrias praticadas, incluindo a primeira quando foi extraído o soro normal. As sangrias (15 ml de sangue) foram feitas por seção da veia marginal da orelha.

Para obtenção do soro, o sangue foi colocado a temperatura ambiente por 2 horas e logo depois a 5°C por uma noite, centrifugando no fim a 10.000 rpm por 10 minutos o sangue coagulado.

Ao soro obtido foi adicionada azida de sódio a 0.02% e colocado, após previa identificação, em congelador para ser conservado.

Tabela 4. Injeções e sangrias praticadas para a obtenção de antissoros dos isolados A4 e R12 de *C.gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

DIA	INJEÇÃO		Volume de Antígeno	SANGRIA
	IM ¹	IV ²		
1	+ ³	- ⁴	0.5 ml	+
4	+	-	0.5 ml	-
9	+	-	0.5 ml	-
13	-	+	0.5 ml	-
17	-	+	0.6 ml	-
21	-	+	0.6 ml	+
25	-	+	0.6 ml	-
31	-	+	0.8 ml	-
35	-	+	0.8 ml	-
41	-	-	-	+
49	-	-	-	+
56	-	-	-	+
63	-	-	-	+
70	-	-	-	+
77	-	-	-	+

1 IM = intramuscular, com adjuvante completo de Freund.

2 IV = intravenosa

3 + = foi realizado

4 - = não foi realizado.

3.6.3. Preparo dos antígenos para reação

Os antígenos para reação na técnica de dupla difusão em ágar foram preparados através de maceração de esporos em almofariz, com adição de areia (malha 40, lavada com ácido clorídrico) e nitrogênio líquido. Os esporos tinham sido produzidos em meio de aveia (cultura de 10 dias sob luz contínua), e posteriormente lavados e centrifugados conforme descrito em 3.6.1, sendo ajustados a 7×10^6 conídios/ml. Após a maceração, os conídios foram resuspensores em solução salina tamponada (NaCl, 8 g; KH_2PO_4 , 0,2 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,9 g; KCl, 0,2 g; NaN_3 , 0,2 g; água destilada, 1000 ml), recompondo o volume inicial. Para separar a areia e os esporos não macerados, a suspensão foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos. O antígeno assim obtido foi conservado no congelador.

Estes antígenos foram preparados com todos os isolados de antracnose e ramulose listados na Tabela 1, assim como com os outros *Colletotrichum* que aparecem na Tabela 2.

Também foi obtido antígeno para as reações serológicas de dupla difusão em ágar partindo de micélio crescido em meio batata-dextrose sem ágar por 15 dias a 28-30°C. O bolo de micélio crescido no meio líquido foi lavado cuidadosamente com água destilada estéril, visando eliminar os conídios e macerado numa proporção de 1 ml de solução salina tamponada para cada 0,5 g de micélio (em peso fresco), após ser secado em várias camadas de papel toalha. A maceração e procedimentos posteriores foram semelhantes aos utilizados com os conídios.

Estes antígenos foram preparados com todos os isolados listados na Tabela 1.

Para a comparação serológica envolvendo a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) os antígenos utilizados foram uma suspensão de 10^6 conídios/ml de solução salina tamponada e uma cultura do fungo preparada em lâmina. Essas culturas cresceram numa gota de meio BDA colocada sobre uma lâmina de microscópio estéril, suportada por um bastão de vidro sobre papel úmido numa placa de Petri estéril. O meio foi inoculado por toque com uma alça molhada numa suspensão de conídios no centro da gota, e incubado a 28°C por 72 horas.

A suspensão de conídios foi preparada para os isolados listados nas Tabelas 1 e 2, e as culturas em lâmina para todos os listados nas Tabelas 1, 2 e 3.

3.6.4. Determinação da especificidade do antissoro

A mesma foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI).

Testaram-se os dois antissoros preparados contra os antígenos desenvolvidos, conforme descrito em 3.6.3, para todos os isolados listados nas Tabelas 2 e 3.

3.6.5. Titulação dos antissoros

A titulação dos antissoros foi realizada através da técnica de aglutinação em tubo.

Os antissoros e o soro normal foram diluídos em solução salina, seriadamente e ao meio, partindo de 1/5 e até 1/10240 para cada uma das 7 extrações realizadas.

O antígeno era composto por uma suspensão de 7×10^6 conídios/ml de salina solução tamponada centrifugada e lavada por duas vezes, conforme descrito em 3.6.1, para cada um dos isolados homólogos (A4 e R12).

Um mililitro de cada diluição do antissoro e outro de antígeno foram colocados em tubos de 75 x 12 mm, incubados por 6 horas a 37°C e logo depois por 2 dias na geladeira. A observação foi feita agitando o tubo na frente de uma luz fluorescente e comparando com o soro normal, de acordo com uma escala de notas de 0 até 4; onde:

0	=	Botão compacto de conídios não aglutinados no fundo do tubo, aparência semelhante à do controle.
1	=	Botão no centro do tubo com uma pequena camada difusa de conídios não aglutinados ao seu redor e turbidez no sobrenadante igual à do tubo controle.
2	=	Pequeno botão de conídios não aglutinados no centro do tubo com uma camada difusa de conídios aglutinados ao seu redor e turbidez significativa no sobrenadante.
3	=	Camada menos densa de conídios cobrindo a maior parte do fundo do tubo, com ligeira turbidez no sobrenadante.
4	=	Camada de conídios aglutinados cobrindo todo o fundo do tubo, com bordas rugosas e sem turbidez no sobrenadante.

3.6.6. Teste de dupla difusão em ágar de Outcherlony

O teste foi realizado em lâminas, em 5 ml de um meio preparado com: 8% Bacto Agar (DIFCO), 0,85% NaCl e 0,02% de NaN₃.

Depois de solidificadas foram feitos orifícios no gel com o aparelho "FURAGAR" (LEITE e OLIVEIRA, 1975), de 0,25 cm de diâmetro, numa distribuição hexagonal.

Depois de abertos com o auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios foram preenchidos duas vezes com antígeno ou antissoro.

O antígeno tinha sido preparado de acordo com o item 3.6.3 e o antissoro puro foi uma mistura do obtido nas 5ª, 6ª e 7ª coletas.

As lâminas permaneceram no interior de placas de Petri com chumaços de algodão embebidos em água a temperatura ambiente.

A avaliação do teste foi feita às 24 e 48 horas após o seu preparo por observação, com luz indireta, das bandas de precipitação formadas.

3.6.7. Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

Este teste foi realizado com os antígenos descritos em 3.6.3.

No caso da suspensão de conídios, 25 microlitros foram dispersados num quadrado de 1 cm de lado, traçado com lápis indelével sobre a lâmina e fixados com calor.

Para a cultura sobre lâmina, ela foi fixada por imersão em acetona por 20 minutos.

Posteriormente usou-se o procedimento indicado por FAURE *et alii* (1977) numa diluição 1/10 dos antissoros e 1/16 da imunoglobulina de cabra, anti-coelho, conjugada com isotiocianato de fluoresceína.

As incubações foram de 30 minutos a 25°C, no escuro em câmara úmida e duas lavagens com salina tamponada foram feitas depois da exposição ao antissoro e ao conjugado.

As preparações montadas em tampão glicerol (pH = 7.6) foram examinadas num microscópio com equipamento para epifluorescência PLOEMOPAK 2.4, marca Leitz, com lâmpada de halogênio 12V/10CW, bloco de filtros I2 e filtro excitador BP 450-490.

Como controle negativo foram usadas lâminas tratadas com soro normal e com salina tamponada em vez do antissoro.

A leitura foi feita conforme uma escala de 0 a +++, onde:

0	=	sem fluorescência
+	=	baixa fluorescência
++	=	média fluorescência
+++	=	alta fluorescência

3.7. Sensibilidade a fungicidas de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

O ensaio de sensibilidade a fungicidas foi desenvolvido sob condições "in vitro".

Foram avaliados 6 fungicidas em 3 concentrações (1; 10; 100 ppm de i. a.) mais a testemunha.

Os fungicidas utilizados estão inseridos na Tabela 5 e os isolados de antracnose e ramulose são os listados na Tabela 1.

O preparo do meio de cultura com fungicida foi feito conforme descrito em 3.1.

Discos de 4,5 mm de diâmetro, contendo crescimento micelial dos bordos das colônias em meio BDA, foram transferidos para placas de Petri, contendo ao redor de 20 ml de meio BDA suplementado com fungicidas, nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml de ingrediente ativo e a testemunha sem fungicida. Em cada placa colocaram-se em forma equidistante três discos de três diferentes isolados.

Tabela 5. Nome comercial, nome técnico, formulação e concentração de ingrediente ativo (%) dos fungicidas testados na sensibilidade "in vitro" de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

NOME COMERCIAL	NOME TÉCNICO	Formulação e concentração de ingrediente ativo (%)
Benlate	Benomyl	Pó - molhável 50%
Captan	Captan	Pó - molhável 50%
Vitavax 750	Carboxin	Pó - molhável 75%
Brassicol	Quintozène (PCNB)	Pó - molhável 75%
Mayran	Thiram (TMTD)	Pó - molhável 70%
Baytan 250	Triadimenol	Pó - molhável 25%

Após a inoculação, as placas foram incubadas em ambiente de laboratório sob luz contínua a 28 - 30°C.

A capacidade inibitória dos fungicidas "in vitro" foi avaliada após 48 e 96 horas de incubação, onde se procedeu à medição do diâmetro das colônias no verso da placa de Petri em 2 sentidos, tomando-se como valor em milímetros a média das duas medidas.

Ao valor da concentração (0) sem fungicida foi atribuído 100%, isto é, o máximo crescimento micelial da colônia. Nas demais medidas foram atribuídos valores proporcionais ao crescimento micelial obtido, comparado com a testemunha. A partir destes valores, calculou-se a porcentagem de crescimento micelial tanto para *C. gossypii* como para *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Para cada dose de fungicida foram feitas 3 repetições para cada isolado.

4. RESULTADOS

No Apêndice listam-se os valores das diferenças mínimas significativas, usadas nas comparações de médias.

4.1. Diferenciação cultural de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

4.1.1. Comparação do crescimento micelial de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em meio mínimo MM (PONTECORVO, 1953) e meio mínimo MPS (PUHALLA & SPIETH, 1983)

Os resultados obtidos nas avaliações feitas às 48 e 96 horas de incubação, pela medição do crescimento linear dos 6 isolados de antracnose e 6 de ramulose são apresentados na Tabela 6. A análise comparativa entre isolados de antracnose e ramulose foi impossível, pois, como mostra a Tabela 6, os isolados R8, R9, R10, R11 e R12 não cresceram em nenhum dos dois meios de cultura. O isolado R7 mostrou um comportamento diferente, depois de 96 horas de incubação em meio MM, teve crescimento de cor clara, raso e apenas perceptível ao redor do disco com que a placa tinha sido inoculada.

Em meio MPS, o isolado R7 cresceu apenas às 48 horas de incubação e teve um desenvolvimento quase comparável ao dos isolados de antracnose depois de 96 horas. De qualquer modo, a cor do micélio foi bem mais clara do que a dos isolados de antracnose e só depois de pelo menos 7 dias de incubação teve um aspecto semelhante ao dos isolados A1 até A6.

Tabela 6. Crescimento micelial de seis isolados de *C. gossypii* (A1-A6) e seis de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R7-R12) em meios mínimos MM (PONTECORVO, 1953) e MPS (PUHALLA & SPIETH, 1983).

Diâmetro (mm) da colônia nos meios de:				
Isolados	MPS		MM	
	Horas de incubação		Horas de incubação	
	48	96	48	96
A ₁	11,66 *	38,33	15,16	48,2
A ₂	13,50	34,50	12,16	39,16
A ₃	15,83	48,66	17,16	47,00
A ₄	10,16	35,83	9,33	37,16
A ₅	13,29	40,93	18,83	47,66
A ₆	15,33	46,83	17,16	45,5
R ₇	11,50	36,33	0,00	12,16
R ₈	0,00	0,00	0,00	0,00
R ₉	0,00	0,00	0,00	0,00
R ₁₀	0,00	0,00	0,00	0,00
R ₁₁	0,00	0,00	0,00	0,00
R ₁₂	0,00	0,00	0,00	0,00

* Médias de 3 repetições.

4.1.2. Efeito do cloreto de trifênil tetrazolío nas características culturais de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Quanto ao efeito da inclusão das doses 0,005; 0,02 e 0,04% de cloreto de trifênil tetrazolío no meio de cultura BDA, os resultados aparecem na Tabela 7. Houve diferenças significativas entre as doses a que os diferentes isolados foram submetidos, entre isolados e na interação doses x isolados. A análise de variância mostrou falta de diferenças significativas no crescimento em BDA sem a adição do cloreto de trifênil tetrazolío. Com a adição de uma dose baixa (0,005%) de cloreto de trifênil tetrazolío a maioria dos isolados de antracnose (A1, A3, A4, A5 e A6), acompanhados do isolado R7, não diferiram significativamente entre eles, mas sim do resto dos isolados (A2, R9, R10, R11 e R12). O isolado R8 comportou-se de forma totalmente diferente dos demais.

À dose média (0,02%), estas tendências persistiram: o isolado R7 comporta-se como diferente do seu grupo e integrado ao grupo da antracnose, formado pelos isolados A1 até A6 pelo seu crescimento significativamente maior. A dose alta (0,04%) e na média dos isolados pode ser notada essa mesma separação entre os isolados A1, A2, A3, A4, A5, A6 e R7 do restante. Entre todos os isolados de antracnose (exceto o A2) e o isolado R7 não houve diferença significativa entre as doses 0 e 0,005, fato que aconteceu com os isolados R8, R9, R10, R11, R12 e A2. As médias dessas doses diferiram significativamente com as das doses média e alta, independentemente do isolado.

Quanto às características de cor, forma e aspecto de colônia, puderam ser diferenciados 4 tipos de crescimento às 96 horas e nas doses 0,02 e 0,04% de cloreto de trifênil tetrazolío.

Tabela 7. Efeito de diferentes doses de cloreto de trifênil tetrazólio no crescimento micelial de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Isolados	Crescimento micelial mm				
	Doses (%)				Médias
	0	0.005	0.02	0.04	
A ₁	55.00 a A	55.00 a A	46.66 a B	45.00 a B	50.41 a
A ₂	55.00 a A	39.16 b B	36.66 b c B	35.00 c d B	41.45 d
A ₃	55.00 a A	55.00 a A	45.33 a b B	40.00 a b c C	48.83 a b
A ₄	55.00 a A	55.00 a A	41.00 b c B	35.50 c d C	46.62 b c
A ₅	55.00 a A	55.00 a A	45.50 a b B	41.00 a b C	49.12 a b
A ₆	55.00 a A	55.00 a A	45.00 a b B	36.00 b c d C	47.75 b c
R ₇	55.00 a A	55.00 a A	37.50 c B	33.50 d B	45.25 c
R ₈	55.00 a A	24.00 c B	15.00 e C	13.50 g C	26.87 g
R ₉	55.00 a A	37.50 b B	21.50 d C	15.50 g D	32.37 f
R ₁₀	55.00 a A	40.00 b B	23.50 d C	21.00 f C	34.87 f
R ₁₁	55.00 a A	40.00 b B	23.50 d C	21.00 f C	34.87 f
R ₁₂	55.00 a A	42.50 b B	26.00 d C	26.50 e C	37.5 e

C.V = 4.014%

- . Letras minúsculas comparam médias na vertical, maiúsculas na horizontal.
- . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- . Médias de 3 repetições após 96 horas de incubação

Tipo 1 - Corresponde aos isolados A1, A3, A4, A5 e A6.

Colônia de borda contínua com um centro bem marcado, de cor rosa salmão onde se produz abundante esporulação, separado da borda de micélio branco por uma linha de cor marrom esverdeado. Vista de lado a colônia é levantada nitidamente em relação ao meio. No reverso da placa observa-se uma coloração rosa escura, típica da transformação do tetrazolio para formazan.

Tipo 2 - Corresponde ao isolado R7.

A borda da colônia mostra-se irregular e pelo resto apresenta as mesmas características que o Tipo 1, exceto pela cor vermelha escura que aparece no reverso. O seu crescimento não é tão alto, salvo no meio da colônia.

Tipo 3 - Corresponde ao isolado A2.

A colônia tem bordas irregulares e a cor que aparece no reverso é salmão bem clara, nas demais características se assemelha as descrições anteriores.

Tipo 4 - Corresponde aos isolados R8, R9, R10, R11 e R12.

Na superfície a colônia apresenta um centro de cor rosa salmão, mas o resto do micélio é branco, com estrias radiais e completamente raso. No verso a colônia é de um rosa bem claro, diferente da cor que os outros 3 tipos apresentam, independentemente da concentração de cloreto de trifênil tetrazolio.

4.2. Diferenciação patogênica de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

4.2.1. Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, na produção de tombamento de plântulas do cultivar IAC 20

Os resultados obtidos da avaliação do número de plântulas sobreviventes são mostrados na Tabela 8. Observa-se que existem diferenças significativas entre concentrações de inóculo em relação aos isolados utilizados e entre isolados. A testemunha e a concentração 10^2 para ambos isolados e 10^3 para ramulose não diferiram estatisticamente, causando os menores valores de mortalidade de plântulas. Por outro lado, destaca-se o comportamento da concentração 10^5 de A3 causando o maior valor de morte de plantas.

Comparando à mesma dose, os dois isolados, pode ser obtida a Figura 1 onde se percebe que a evolução geral da mortalidade é diferente, de acordo com o isolado utilizado.

No caso da antracnose a tendência é descendente, mesmo até a dose 10^5 ; no da ramulose, a partir de 10^4 , pode se observar um achatamento da curva, que não responde ao aumento na dose de inóculo.

Tabela 8. Sobrevivência de plântulas do cultivar IAC 20 de algodão, submetidas a diferentes concentrações de inóculo dos isolados A3 e R12 de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Concentração de inóculo		Nº de plantas sobreviventes (x) inoculadas com os isolados:					
		R ₁₂		A ₃		Médias	
		x	$\sqrt{x + 0.5}$	x	$\sqrt{x + 0.5}$	x	$\sqrt{x + 0.5}$
0	8.25	2.95 a		8.25	2.95 a	8.25	2.95 a
10 ²	6.75	2.69 a b		6.00	2.54 a b	6.37	2.61 a b
10 ³	5.75	2.8 a b		3.25	1.92 c d	4.50	2.20 b c
10 ⁴	4.50	2.20 b c		2.25	1.62 d	3.37	1.91 b c
10 ⁵	4.50	2.22 b c		1.66	1.46 d	3.28	1.89 c
Médias	5.95	2.51 A		4.42	2.13 B		

C.V = 11.05%

- . Dados médios de 4 repetições, aos 15 dias da semeadura. Cada repetição foi representada por um vaso semeado com 10 sementes.
- . Letras minúsculas comparam médias na vertical, maiúsculas na horizontal.
- . Médias de doses e isolados comparadas a 5% de probabilidade; dados centrais a 10% de probabilidade.

Figura 1. Evolução do número de plantas sobreviventes, em função da concentração de inóculo de *C. gossypii* (A3) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R12).

* Média de 4 repetições, aos 15 dias da semeadura, dados originais.

Não existe de fato diferença significativa entre o efeito das concentrações 10^4 e 10^5 de antracnose e ramulose. O efeito da concentração 10^3 de antracnose não difere estatisticamente das concentrações 10^4 e 10^5 de antracnose e ramulose. Também, é significativa a diferença entre a média dos dois isolados, independentemente da dose. Quanto às médias das doses, sem considerar o isolado usado, não se registram diferenças entre a concentração 10^2 e a testemunha, mas sim entre as concentrações 10^2 e 10^5 , sendo que esta última produz a maior percentagem de tombamento. O comportamento das concentrações 10^3 e 10^4 é intermediário.

4.2.2. Patogenicidade de 6 isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em plântulas do cultivar IAC 20 de algodão

Os resultados obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 9. O teste de Tukey desenvolvido para dados originais e transformados em $\sqrt{x+0,5}$ com um $\alpha = 10\%$ mostram que, no caso dos dados transformados, só existe diferença significativa entre a testemunha sem inocular e o isolado A4, embora os dados não transformados não ofereçam esse tipo de diferença entre qualquer um dos isolados usados.

Feitos os contrastes ortogonais entre o grupo de isolados que representam o *C. gossypii* (A1, A3, e A4) e o *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R1, R10 e R12) com os dados transformados a $\sqrt{x+0,5}$, ou não, eles foram significativos ao 5% de probabilidade mostrando que há diferença entre os dois grupos, quanto a sua capacidade de produzir tombamento de plântulas no mesmo cultivar e a baixa concentração de inóculo. O grupo de isolados de antracnose foi então potencialmente mais agressivo em plântulas do que o da ramulose com um 95% de confiabilidade, fato que resulta evidente observando a percentagem média de sobrevivência para cada grupo, que foi de 46,66% para a antracnose e de 60,83% para a ramulose.

Tabela 9. Efeito da inoculação de 6 isolados de *C.gossypii* e *C.gossypii* var. *cephalosporioides* à concentração de 10^2 conídios/ml, no cultivar IAC 20.

Nº de plantas sobreviventes (x)		
Isolados	x	$\sqrt{x + 0.5}$
Testemunha	8.25 a	2.95 a
R ₁₀	7.00 a b	2.73 a b
R ₁₂	6.25 a b	2.59 a b
R ₇	5.00 a b	2.32 a b
A ₁	4.75 b	2.78 a b
A ₃	4.75 b	2.23 a b
A ₄	4.50 b	2.18 b
C.V = 27.71%		C.V = 14.53%

- . Média de 4 repetições, aos 15 dias de semeadura. Cada repetição foi representada por um vaso semeado com 10 sementes.
- . Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 10% de probabilidade.

4.2.3. Patogenicidade de *C.gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em ápices destacados de plantas de algodão do cultivar IAC 20

Os resultados obtidos aos 7 e 10 dias da inoculação, aparecem na Tabela 10. Tendo claro que o objetivo deste experimento foi procurar diferenças entre a antracnose e a ramulose em relação a sua patogenicidade em ápices destacados, é evidente que não há sentido prático fazer a análise estatística dos tratamentos, desde que o *C. gossypii* não foi, em nenhum caso, capaz de atacá-los. No caso de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, essa capacidade foi variável, de acordo com o isolado utilizado (de 40% até 90% dos ápices).

Tabela 10. Efeito da inoculação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em ápices destacados de plantas de algodão do cultivar IAC 20.

Isolado	Nº de ápices mortos / Nº de ápices inoculados	
	Com incubação de:	
	7 dias	10 dias
A ₁	0/10	0/10
A ₂	0/10	0/10
A ₃	0/10	0/10
A ₅	0/10	0/10
R ₇	5/10	9/10
R ₉	6/10	7/10
R ₁₀	4/10	6/10
R ₁₂	5/10	6/10

* Inoculação por aspersão com 10⁵ conídios/ml.

4.3. Diferenciação serológica de *C.gossypii* e *C.gossypii* var. *cephalosporioides*

4.3.1. Título dos antissoros

Os títulos dos antissoros preparados com os isolados A4 e R12 são apresentados nas Tabelas 11 e 12. O antissoro preparado contra o isolado A4 de *C. gossypii*, teve um título ligeiramente maior ao fim de 7 extrações, mas em linhas gerais a evolução foi semelhante para os dois soros. Eles reagiram com seus antígenos homólogos a partir da 1ª sangria (3 semanas após o início das injeções). Para fins práticos é aconselhável tomar como título do antissoro aquele com um nível de reação de 3 pelo menos, com o que os títulos obtidos seriam de 1/320 para ambos .

4.3.2. Especificidade dos antissoros

As reações de imunofluorescência de culturas em lâminas foram totalmente negativas para todos os casos de fungos de isolamento comum (Tabela 3) testados, podendo se concluir que o antissoro foi específico ao gênero tendo em conta os resultados obtidos na Tabela 15 com outros fungos do gênero *Colletotrichum*.

Tabela 11. Reação de titulação do antissoro anti *C. gossypii* (A₄), com o antígeno homólogo, nas 7 extrações realizadas.

Intensidade de reação serológica nas diluições do antissoro de:												
Extração	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/16	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
5	3	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0	0
6	4	4	3	3	3	2	2	2	2	1	0	0
7	4	4	4	4	4	3	3	2	2	2	1	0

* De acordo com a escala apresentada em 3.6.5, pelo teste de aglutinação em tubo.

** Soro normal.

Tabela 12. Reação de titulação do antissoro anti *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R₁₂), com o antígeno homólogo, nas 7 extrações realizadas.

Intensidade de reação serológica nas diluições do antissoro de:												
Extração	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/16	01/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
5	3	3	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
6	4	4	3	3	3	2	2	2	1	1	0	0
7	4	4	4	4	3	3	3	2	2	1	0	0

* De acordo com a escala apresentada em 3.6.5, pelo teste de aglutinação em tubo.

** Soro normal.

4.3.3. Comparação serológica pelo teste de dupla difusão em ágar

A reação serológica dos antissoros anti *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com antígenos produzidos a partir de conídios de vários fungos do gênero *Colletotrichum*, incluídos os seus homólogos, é listada na Tabela 13. O número de linhas de precipitação foi variável, mas sempre consistiu em duas linhas, no caso dos isolados da espécie *gossypii*, evidenciando a existência de pelo menos 2 antígenos comuns à espécie. A reação serológica com outros fungos do mesmo gênero foi importante e em algum caso diferente para os dois antissoros. Os antígenos de pêra e uva (CPE e CUV) tiveram diferente número de linhas de precipitação com cada antissoro, chegando até 3 no caso do CUV vs. o antissoro para *C. gossypii*. Não houve reação com os antígenos preparados a partir de isolados de maçã, morango e jiló (CMAC, CMO, CJI) com nenhum dos dois antissoros.

Foi evidente que ao nível do gênero *Colletotrichum*, e dentro dele na espécie *gloeosporioides* existem antígenos comuns em número variável de 0 até 3.

O *Colletotrichum acutatum* não reagiu serologicamente com estes antissoros, e o *Colletotrichum musae* teve uma reação limitada a 1 linha de precipitação.

No caso de ser usado como antígeno o macerado de micélio, os resultados aparecem na Tabela 14. Houve uma reação diferente, no caso de cada antissoro para cada grupo de antígenos. O antissoro anti A₄, reagiu com 2 linhas de precipitação, com todos os antígenos de antracnose e o do isolado R₇ de ramulose. A mesma coisa aconteceu com o antissoro anti R₁₂, só que com só uma linha de precipitação.

Tabela 13. Reação de antissoros anti *C. gossypii* (A₄) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R₁₂) com antígenos produzidos a partir de conídios de fungos do gênero *Colletotrichum*, pela técnica de dupla difusão em ágar.

Antígeno do isolado	Nº de linhas de precipitação com os antissoros:	
	A ₄	R ₁₂
A ₁	2	2
A ₂	2	2
A ₃	2	2
A ₄	2	2
A ₅	2	2
A ₆	2	2
R ₇	2	2
R ₈	2	2
R ₉	2	2
R ₁₀	2	2
R ₁₁	2	2
R ₁₂	2	2
CPE	2	1
CUV	3	1
CMAC	0	0
CMO	0	0
CBA	1	1
CBE	1	1
CMAM	2	2
CPI	1	1
CJI	0	0

Os antígenos miceliais da ramulose (isolados R8 até R12) não reagiram com nenhum dos 2 antissoros. Evidencia-se então a existência de 1 ou 2 antígenos comuns entre os conídios e o micélio dos isolados de antracnose e o A7 de ramulose. Não existiram evidências da presença de antígenos comuns entre os conídios de A4 e R12 e o micélio da maioria dos isolados de ramulose (R8, R9, R10 e R12).

Tabela 14. Reação de antissoros anti *C. gossypii* (A₃) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R₁₂) com antígenos produzidos a partir de micélio dos mesmos fungos, pela técnica de dupla difusão em ágar.

Antígeno do isolado	Nº de linhas de precipitação com os Antissoros	
	A ₄	R ₁₂
A ₁	2	1
A ₂	2	1
A ₃	2	1
A ₄	2	1
A ₅	2	1
A ₆	2	1
R ₇	2	1
R ₈	0	0
R ₉	0	0
R ₁₀	0	0
R ₁₁	-	-
R ₁₂	0	0

- : Reação não realizada.

4.3.4. Comparação serológica pelo teste de imunofluorescência indireta

A comparação serológica por este teste com o uso de antígenos conidiais ou por cultura em lâmina são mostrados na tabela 15. Praticamente não existiram diferenças nos níveis de reação obtidos com os dois antígenos. A reação de fluorescência foi de intensa a média com todos os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, independentemente do antissoro testado e tanto nos conídios quanto no micélio.

No caso de outros antígenos, de outros *Colletotrichum* das espécies "*gloeosporioides*", "*acutatum*" e "*musae*", a reação foi variável em intensidade, até 0 no caso dos isolados CMAC, CMO e CJI. O isolado CMAM destacou-se pela sua intensa fluorescência com os dois antissoros.

Não existiram, evidências de diferenciação serológica ao nível de antígenos superficiais, pela técnica de imunofluorescência indireta entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Tabela 15. Reação dos antissoros anti *C. gossypii* (A₄) e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (R₁₂) com diversos antígenos de fungos de gênero *Colletotrichum* pela técnica de Imunofluorescência indireta.

Antígeno do isolado	Intensidade de reação com os antissoros *			
	A ₄		R ₁₂	
	Lâmina	Suspensão	Lâmina	Suspensão
A1	+++	+++	+++	+++
A2	+++	+++	++	+++
A3	+++	+++	+++	+++
A4	+++	+++	+++	+++
A5	+++	+++	++	++
A6	+++	+++	++	++
R7	+++	+++	+++	+++
R8	++	++	+++	+++
R9	++	++	+++	+++
R10	+++	+++	+++	+++
R11	+++	+++	+++	+++
R12	+++	+++	+++	+++
CPE	+	+	+	+
CUV	+	+	+	+
CMO	0	0	0	0
CBA	++	++	++	++
CBE	++	++	++	+++
CMAM	+++	+++	+++	+++
CPI	+	+	+	+
CJI	0	0	0	0
CMAC	0	0	0	0

* Fluorescência intensa (+++), média (++) , baixa (+) e nula (0).

4.4. Sensibilidade a fungicidas de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*

Os dados obtidos, correspondentes a percentagem média de crescimento, dos 12 isolados testados, ao nível correspondente de dose de cada fungicida são apresentados na Tabela 16.

A análise estatística dos dados mostra diferenças importantes entre fungicidas ao nível de 10% de probabilidade e a 5% entre doses.

A diferença entre fungicidas coloca o Captan como o menos eficiente para o controle "in vitro" de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Na dose máxima (100 ppm) o Captan diferiu claramente das doses menores, sendo então sua $ED_{50} > 100$ o oposto aconteceu com o Benomyl que foi o mais eficiente, independente da dose usada. Neste caso, a ED_{50} seria < 1 .

O Quintozene e o Carboxin se comportaram de forma semelhante, sendo que para o primeiro a ED_{50} é < 10 e para o segundo > 10 . O Carboxin teve um comportamento claramente diferente entre suas doses, o que se reflete na análise dos dados. No caso do Quintozene a diferença registrou-se entre a dose de 1 ppm e as outras, que não diferiram estatisticamente entre si. O Triadimenol teve um comportamento intermediário, mas foi o que controlou melhor o crescimento do fungo, depois do Benomyl. Sua ED_{50} foi > 10 , com diferenças significativas entre todas as doses testadas.

Quanto ao Thiram, foi um dos menos eficientes, estatisticamente diferente ao Captan, sua ED_{50} foi > 10 e suas doses menores (1 e 10 ppm) não diferiram entre si, mas sim da dose maior.

O comportamento médio dos isolados, com respeito a sua sensibilidade aos fungicidas, é mostrado na Tabela 17. Observa-se que não houve uma clara diferenciação entre o grupo da antracnose e o da ramulose, embora se constate que a maioria dos isolados de antracnose (A1, A4, A5 e A6) se diferencia claramente dos de ramulose (R7, R8, R11 e R12). O isolado R7 teve um comportamento particularmente sensível aos fungicidas, não se diferenciando do isolado A3.

Quanto ao efeito médio das doses, independentemente do fungicida, as mesmas diferiram estatisticamente ao nível de 10% entre elas. No tocante ao efeito dos isolados dentro de fungicidas é interessante constatar que o Thiram diferenciou por sensibilidade os isolados da ramulose dos da antracnose. Contrastadas as médias dos valores de crescimento diametral transformadas para os dois grupos de isolados (A1

- A6 e R7 - R12), em meio com este fungicida as mesmas foram significativamente diferentes aos níveis de 5% e 1% de probabilidade. A média para o grupo de antracnose foi de 63,34, e para o da ramulose de 53,64, com DMS de 3,84 ($\alpha = 0,01$) e de 6,63 ($\alpha = 0,05$).

Tabela 16. Efeito de 6 fungicidas, a 1, 10 e 100 ppm sobre o crescimento de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Diâmetro de colônia (% da testemunha)				
Fungicida	Concentração (ppm)	x	arc. sen $\sqrt{x/100}$	Média arc. sen $\sqrt{x/100}$
Benomyl	1	10,51	18,89 g	18,89 E
	10	10,51	18,89 g	
	100	10,51	18,89 g	
Thiram	1	86,50	72,33 b c	58,50 B
	10	80,14	66,17 c	
	100	36,91	36,99 d e	
Captan	1	99,04	82,75 a	77,59 A
	10	97,21	80,58 a b	
	100	87,08	69,44 c	
Quintozène	1	101,27	86,68 a	52,36 C
	10	35,54	36,44 d e f	
	100	31,38	33,96 e f	
Triadimenol	1	85,47	69,21 c	48,50 D
	10	51,00	45,48 d	
	100	26,77	30,82 e f	
Carboxin	1	100,80	84,97 a	52,09 C
	10	49,674	44,76 d	
	100	20,07	26,54 f g	

C.V. = 7.09

- Dados médios de 12 isolados, listados na Tabela 1, com três repetições/dose/ isolado.
- Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 5%.
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente ao nível de 10%.

Tabela 17. Comportamento médio de 12 isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em relação ao seu crescimento em meio de cultura suplementado por 6 fungicidas em tres doses.

Crescimento micelial (% da testemunha)		
Isolado	x	arc.sen $\sqrt{x/100}$
A1	61,63	55,41 A
A2	55,42	49,08 C D
A3	50,93	47,63 D E
A4	61,00	54,83 A B
A5	58,44	52,77 B
A6	59,55	54,16 A B
R7	50,65	46,24 E
R8	55,10	49,59 C D
R9	61,25	54,05 A B
R10	59,02	52,97 B
R11	54,81	50,16 C
R12	53,45	48,95 C D

C.V. = 7.09%

- Dados do comportamento em meio suplementado com 6 fungicidas listados na Tabela 5, a três doses (1, 10 e 100 ppm).
- Medias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 10%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Características culturais e de patogenicidade

Utilizando meios mínimos foi fácil diferenciar isolados de *C. gossypii* dos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, exceto no caso de meio MPS para o isolado 7. Esse meio mínimo é basicamente composto por sacarose e sais, contendo nitrato como fonte de nitrogênio, é usado para reconhecer mutantes "nit" e para testes de complementação (heterocariose) (KATAN & KATAN, 1988). O meio mínimo MM, de PONTECORVO et alii (1953) tem uma composição semelhante, com a mesma fonte de nitrogênio e a glucose como fonte de carbono. Neste caso, ao não ser suplementado com solução de Fries como foi reportado por DUDIENAS (1990), resultou num meio pobre em microelementos.

De qualquer modo, no caso do meio MM, os resultados concordaram claramente com os obtidos por DUDIENAS (1990). Para os 6 isolados de antracnose o crescimento foi variável, mas indiferenciável entre isolados, o que confirma o comportamento auxoautotrófico, citado pelo autor anteriormente nomeado para três isolados e por FOLLIN & MANGANO (1983) para um isolado procedente da África. No caso dos 6 isolados de ramulose, o R7 foi parcialmente deficiente, fato observado por FOLLIN & MANGANO (1983) para biotina e tiamina. Os demais comportaram-se totalmente deficientes como reportara DUDIENAS (1990).

COCHRANE (1958) afirma que a asparagina e o ácido aspártico são as duas melhores fontes de nitrogênio para suportar um bom crescimento de fungos, enquanto que CARVALHO (1971) verifica que a asparagina foi uma das melhores fontes de nitrogênio para o crescimento vegetativo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Por outro lado, GRIFFIN (1981) diz que a tiamina e a biotina são as deficiências mais comuns em fungos.

Em relação ao aspecto taxonômico, FRIES (1965) assinala que a auxoheterotrofia pode ser considerada como uma característica fisiológica útil na identificação de espécies, nos casos particulares em que as características morfológicas são poucas ou pouco confiáveis, e faz uma revisão de casos que avaliam essa tese. Também indica que a reversão da auxoheterotrofia para auxoautotrofia é um fenômeno muito raro e essa característica pode auxiliar na identificação de espécies.

GRIFFIN (1981) e COCHRANE (1958) relatam ser a metodologia de determinação da deficiência fundamental. Por exemplo, para o caso das vitaminas, a deficiência poderia ser induzida por condições particulares de temperatura, pH, e concentração de sais; assim como também ser

constatada num estágio particular do desenvolvimento do fungo e não em outros. Desde que as condições dos experimentos foram controladas, e considerando-se os relatos anteriores de FOLLIN & MANGANO (1983) e DUDIENAS (1990) para estes fungos é evidente que os dois grupos são fisiologicamente diferentes, tendo até um isolado de comportamento intermediário entre ambos.

No caso do efeito do cloreto de trifênil tetrazolio nas características culturais de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, o mesmo comportou-se como um bom diferenciador para os dois grupos, sobretudo quando se incorporaram ao meio as doses maiores (0,02 e 0,04%). Segundo KELMAN (1954) o cloreto de trifênil tetrazolio tem sido usado em meios sólidos, para a detecção de mutantes de *Escherichia coli* e de variantes morfológicas de *Pasteurella pestis* e outras bactérias, indicando nesses casos a existência de um metabolismo fermentativo. WILKINSON (1970) descreve que os sais de tetrazolio, particularmente o cloreto de trifênil tetrazolio, tem sido usados no começo para a detecção colorimétrica de uma enzima, a lactato deshidrogenase, e posteriormente de outras do grupo das deshidrogenases. Nessa reação o produto final é o formazan, obtido pela transferência de hidrogênio para o sal de tetrazolio.

O tipo de crescimento também mostrou associação com o grupo de isolados. Os isolados de antracnose (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A_5 , e A_6) e o isolado R_7 tiveram ligeiras diferenças entre eles na coloração, na borda, e no aspecto da colônia; mas a formação de formazan, percebida no verso da placa pela cor vermelha, foi forte e completamente diferente à observada no caso dos isolados R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} .

Estes resultados confirmam a possível diferenciação fisiológica entre o grupo da antracnose e o da ramulose, exceto pelo caso do isolado R_7 , sendo que ele também teve um comportamento diferente em meios mínimos. As características morfológicas observadas em meio de cultura não são suficientes para definí-los como espécies diferentes, mas sim para afirmar que com base nestes resultados, os de DUDIENAS (1990) e os de FOLLIN & MANGANO (1983) a auxoautotrofia da antracnose e a auxoheterotrofia da ramulose são estáveis e observáveis como regra na maioria dos isolados. Isto faz com que além da taxonomia, o uso de meios mínimos ou suplementados possa ter fins práticos para diferenciação rápida de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

A patogenicidade dos dois fungos, quando avaliada em diferentes concentrações de inóculo, na produção de tombamento no cultivar IAC 20, foi diferente e mostrou não só um nível de agressividade maior para o

isolado de antracnose, como também um comportamento diferente entre ambos na curva que relacionou concentração com manifestação de doença.

BALMER *et alli* (1966) estudaram o efeito do potencial de inóculo de *C. gossypii* sobre o tombamento de mudas, concluindo que, de modo geral, a severidade do tombamento aumentava com um aumento no potencial de inóculo. Com 575 conídios/ml o índice de severidade era igual para 17 dos 18 isolados testados, com concentrações menores era possível detectar diferenças entre isolados.

Os resultados obtidos confirmam que a 10^2 conídios/ml não houve diferenças entre os 2 isolados testados dos dois fungos e que, de modo geral, a severidade do tombamento aumenta com o inóculo e de forma diferente para cada um deles. TANAKA (1990) e FOLLIN & MANGANO (1983) concordam também em afirmar que o *C. gossypii* é muito mais patogênico que o *C. gossypii* var *cephalosporioides* em plântulas de algodoeiro, embora os trabalhos tenham sido feitos sobre diferentes cultivares de algodão.

Como no trabalho de TANAKA (1990), quando utilizou a mesma concentração de inóculo, com 3 isolados de cada tipo, o teste de Tukey não mostrou diferenças significativas. Mas neste trabalho caso o contraste dos grupos de médias conseguiu mostrá-las, sendo que as mesmas resultam superiores às obtidas por FOLLIN & MANGANO (1983) para o número de plantas sobreviventes. Elas foram de 46,66% e 60,83% para 3 isolados de antracnose e 3 de ramulose respectivamente, enquanto que para eles só de 2,6 e 34,1% para um isolado de cada tipo.

As diferenças realmente importantes foram obtidas no teste de inoculação de ápices destacados de plantas do cultivar IAC 20. Embora existam diferentes níveis de agressividade nos 4 isolados de antracnose testados, a comparação com os resultados obtidos com a ramulose (4 isolados também) permite confirmar as afirmações feitas desde o momento em que a ramulose foi descrita e mais recentemente por FOLLIN & MANGANO (1983). Estes, em experimentos de inoculação de plantas jovens nunca obtiveram sintomas de crescimento anárquico e só algumas manchas em folhas e pecíolos de plantas inoculadas com *C. gossypii*. Isso mostra uma marcada especialização fisiológica, que também aparece parcialmente segundo FOLLIN & MANGANO (1983) e DUDIENAS (1990) no caso das maçãs. O primeiro acha diferenças notáveis na capacidade de produção de podridão das maçãs entre a antracnose e a ramulose, enquanto que a segunda só obtem essas diferenças em maçãs do cultivar NU-15.

BELL (1967) descreve a formação de gossypol, uma fitoalexina, em tecidos infectados com *Verticillium albo-atrum* ou quimicamente irritados, sugerindo que esta substância está envolvida na resistência

do algodão a doenças fúngicas. Os tecidos mais jovens dos caules que formam quantidades menores de gossypol são mais suscetíveis a vários fungos que os mais velhos. As maçãs, quando mais jovens, formam mais gossypol na medida que sejam infectadas mais cedo, por isso seus tecidos quando infectados mais jovens são mais resistentes.

KUMAR e SUBRAMANIAN (1980) consideram também que o gossypol deve ser o principal fator restritivo para o caso de *Fusarium* spp. em algodão, e que as concentrações de gossypol na porção terminal do caule estão diretamente relacionados com a virulência do isolado testado (o virulento induzindo baixos e o avirulento altos teores). Também a quantidade induzida nessa área da planta foi menor que a formada na base do hipocótilo e nas raízes, sendo este fato crucial na decisão da resistência ou suscetibilidade do hospedeiro. Isso poderia explicar que a diferença em patogenicidade entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var *cephalosporioides* esteja restrita aos ápices meristemáticos e não seja tão clara no caso das maçãs, desde que a concentração da fitoalexina é nesse caso, influenciada pela idade do tecido.

No caso da patogenicidade então, as diferenças entre os dois fungos aparecem tanto na resposta da planta a diferentes níveis de inóculo, quanto na comparação da capacidade de produzir tombamento, e mais claro na capacidade de induzir a morte do meristema apical. Essas diferenças em patogenicidade parecem ser suficientemente marcantes para propor uma divisão mais drástica entre os dois agentes causais, pelo menos enquanto sejam usados ápices do cultivar IAC 20.

5.2. Diferenciação serológica

O título e a especificidade dos antissoros obtidos foram bons e conseguiram fazer uma diferenciação clara a nível de gênero. Tendo em conta que os antissoros foram produzidos com antígenos de conídios dos dois fungos, o teste de dupla difusão em ágar indicou a presença de antígenos comuns na espécie *gossypii* e sua variedade a nível dos conídios e em número de dois. O micélio reagiu de forma diferente e permitiu diferenciar um grupo composto por todos os isolados de antracnose, acompanhados do isolado R₁ de ramulose, que apresentaram 2 antígenos comuns aos conídios do isolado A₁ de antracnose, e 1 antígeno em comum com os conídios do isolado R₁₂ de ramulose. Os isolados de antracnose (R₈, R₉, R₁₀, e R₁₂) não tiveram no seu micélio nenhum antígeno

em comum com os conídios de *C. gossypii* var *cephalosporioides*.

O teste de imunofluorescência indireta, pela sua capacidade de detecção de antígenos externos (FAURE et alii, 1977) não consegue fazer uma distinção entre os isolados dos dois fungos. Foi evidente que aquelas espécies de *Colletotrichum* que não tiveram reação com os antissoros anti *C. gossypii* e *C. gossypii* var *cephalosporioides*, por imunofluorescência, não conseguiram reagir com eles também pela técnica de dupla difusão em ágar; só o *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mamão (CMAM) teve uma reação forte com os antissoros anti A₄ e R₁₂ e os demais que reagiram o fizeram com níveis menores de intensidade.

Considerando agora a possibilidade de diferenciação serológica dos dois grupos, os resultados obtidos permitiram separá-los pela não existência, no micélio dos isolados de ramulose (exceto o R₁), de antígenos comuns com os conídios, de nenhum dos dois grupos. O comportamento do isolado R₁, já tinha se mostrado diferente no seu crescimento micelial em meios mínimos e sua reação à inclusão no meio de cloreto de trifênil tetrazolio. Um detalhe que pode ser importante é que em trabalhos bem recentes de serologia de fungos, empregando técnicas como imunofluorescência ou ELISA, o antígeno de imunização tem sido sempre o micélio, (GENDLOFF, et alii, 1983; JOHNSON et alii, 1982; SKILLING et alii, 1984; MOHAN, 1988; MITCHELL, 1988; AMOVZOU-ALLADAYE et alii, 1988) talvez pela facilidade de obter dele uma boa concentração de proteínas antigênicas.

A reação dos *Colletotrichum* do grupo *gloeosporioides* de ARX (1957) foi em geral positiva aos antissoros preparados, mostrando que do ponto de vista serológico a composição desse grupo é complexa e talvez muito ampla.

5.3 Sensibilidade a fungicidas

A nível da sensibilidade a fungicidas, os dois grupos mostraram diferenças só no caso do Thiram onde os isolados de ramulose foram mais sensíveis que os da antracnose ao fungicida.

Observando o comportamento médio de todos isolados, o R₁ teve a maior sensibilidade aos fungicidas testados.

Não existiu uma diferenciação clara entre grupos (antracnose vs. ramulose) pela sua sensibilidade a todos os fungicidas, mas sim, do ponto de vista prático, dois dos fungicidas mais recomendados como a

Captan e o Thiram deveriam ser aplicados com ressalvas, ou em misturas com outros fungicidas de ação sistêmico, não só pela possível contaminação interna da semente, mas também pela sua baixa eficiência. Deveria considerar-se também a possibilidade de que no caso de novos fungicidas, a sensibilidade dos dois fungos seja diferente, como é o caso do Thiram, ao que o grupo da ramulose é mais sensível.

Para manejar esse tipo de situações é importante conhecer o nível inicial de contaminação das sementes, e além disso a proporção de antracnose ou ramulose nelas presente.

De qualquer modo é de se notar que a ação dos produtos sistêmicos foi a melhor, destacando entre eles o Benomyl, o que é coincidente com a bibliografia (CARVALHO, et alii, 1988; MACHADO & SILVA, 1988).

5.4. Considerações gerais

Tendo em conta a proposição feita por FOLLIN & MANGANO (1983) a respeito da taxonomia de *C. gossypii* e do fungo que a partir desse trabalho eles chamam de *C. gloeosporioides* var *cephalosporioides* (FOLLIN & MANGANO, 1987), os resultados obtidos por DUDIENAS (1990), e os do presente trabalho, seria aconselhável considerar a possibilidade de atualizar a taxonomia destes fungos.

É evidente que estes *Colletotrichum* pertencem morfológicamente ao grupo *gloeosporioides* de ARX (1957) e por isso não podem ser diferenciados a nível de espécie. Entretanto eles não tem o mesmo comportamento a respeito de vitaminas e, ou, outras fontes de nitrogênio o que os diferencia em meios mínimos. Também, a patogenicidade, que é o fator de maior importância no caso dos fungos fitopatogenicos, os separa parcialmente a nível de plântulas e totalmente a nível da sua capacidade de atacar meristemas.

Serologicamente pôde se evidenciar que eles tem relações serológicas importantes com o grupo *gloeosporioides* e reagem também com a espécie *musae*. Contudo o micélio dos isolados de ramulose é carente em algum tipo de proteína que é antigénica a nível dos conídios dos dois grupos.

Por último, a sensibilidade a alguns fungicidas pode diferenciar isolados de ramulose dos de antracnose.

Os dois fungos podem então ser vistos como uma forma especializada de *C. gloeosporioides*, conforme definido por ARX (1953), sendo válida a inclusão nessa espécie sugerida por FOLLIN & MANGANO (1983) com a ressalva de ser necessária a colocação da forma especializada *gossypii*

e utilizando o critério de raça como categoria infrasubespecífica, para explicar as diferenças em patogenicidade das duas.

É por isto que, de acordo com BOMPEIX & COLENO (1984), propõe-se adotar a nomenclatura de *C. gloesporioides* f. sp. *gossypii*, assinalando depois a raça de acordo com:

- causadores de antracnose = Raça 1
- causadores de ramulose = Raça 2

O isolado R₇ deveria ser objeto de posteriores pesquisas para determinar se ele é ou não uma raça diferente das outras duas por técnicas mais sensíveis que permitam comparar o grau de homologia entre isolados como é o caso da determinação de isoenzimas no fungo.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho pode se concluir:

1) *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* difere de *C. gossypii* nos seguintes aspectos: não cresce em meio mínimo de PONTECORVO et alii (1953); é mais sensível ao cloreto de trifenil tetrazólio; tem menor capacidade de provocar sintomas de "damping-off"; consegue produzir sintomas necróticos em meristemas apicais destacados de plantas jovens de algodoeiro, do cultivar IAC 20; apresenta menor número de antígenos miceliais e maior sensibilidade ao Thiram "in vitro".

2) Os resultados obtidos levam a propor a nomenclatura de *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii*, raça 1 para isolados auxoautotróficos, não capazes de produzir morte de ápices e de *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii*, raça 2 para a causadora dos sintomas antes nomeados, apresentando deficiências nutricionais totais em meios mínimos.

3) É possível a existência de outras raças que combinem as características das duas citadas. Maiores pesquisas são necessárias para caracterizar adequadamente o isolado 7 nesse sentido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. & COSTA, A.S. Instruções para o reconhecimento da "ramulose" do algodoeiro. *O Biológico*, São Paulo, 15: 59-60, 1949.
- AMOUZOU - ALLADAYE, E; DUNEZ, J; CLERJEAU, M. Immunoenzymatic detection of *Phytophthora fragariae* in infected strawberry plants. *Phytopathology*, St. Paul, 78: 1022-26, 1988.
- ARAUJO, F.E.; CAVALCANTE, R.D.; CAVALCANTE, M.L.S. Ocorrência de ramulose em algodoeiro herbáceo no Ceará. *Fitossanidade*, Fortaleza, 2: 89, 1978.
- ARDNT, C.H. Effect of storage conditions on survival of *Colletotrichum gossypii*. *Phytopathology*, St. Paul, 36: 24-9, 1946.
- ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 29: 413-68, 1957.
- BAJUNGU, H.E. Caracterização patogênica, serológica e fisiológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz [sensu ARX, 1957] f. sp. *cepae* n.c.. Piracicaba, 1979. 35p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" /USP.)
- BALMER, E.; SALGADO, C; CIA, E.; CAMPOS, H. Efeito do potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* South. sobre o tombamento das mudinhas do algodoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Piracicaba, 23: 325-8, 1966.
- BELL, A.A. Formation of gossypol in infected or chemically irritated tissues of *Gossypium* species. *Phytopathology*, St. Paul, 57: 759-64, 1967.
- BITTANCOURT, A.A. A anthracnose a as falhas no plantio do algodão. *O Biológico*, São Paulo, 1: 402-4, 1935.

- BOMPEIX, G. & COLENO, A.. Problèmes de terminologie des subdivisions intraspécifiques des plantes hôtes des agents pathogènes. In: COLLOQUE DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE PHYTOPHATHOLOGIE, 26, Avignon, 1984. Variation et variabilité des agents phytopathogènes. Paris, INRA, 1984. p45-52. (Les Colloques de l'INRA, 26).
- BURRELL, R.G.; CLAYTON, C.W.; GALLEGLY, M.E.; LILLY, V.G. Factors affecting the antigenicity of the micelium of three species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, St. Paul, 56: 422-6, 1966.
- BUXTON, E.W.; CULBRETH, W.; ESPOSITO, R.G. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul, 51: 575, 1961.
- CARVALHO, A. O. de; CARMO, M.G.F. do; ZAMBOLIM, L. Controle de *Colletotrichum gossypii* em algodão por meio do tratamento de sementes com Benomil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13: 136, 1988.
- CARVALHO, I. Aspectos fisiológicos do fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 4: 1-2, 1971.
- CASTELLANI, D. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, 66: 283-4, 1939.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 3: 167-93, 1977.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G.; GRIDI - PAPP, I.L.; SOAVE, J.; CIONE, J. Avaliação da incidência de ramulose do algodoeiro através de inoculação artificial. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 2., Salvador, 1982. *Resumo*, Campina Grande, EMBRAPA CNPA, 1982. p.241.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York, John Wiley, 1958. 524p.

- COSTA, A.S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*. *Jornal de Agronomia*, São Paulo, 2: 265-8, 1939.
- COSTA, A.S. & FRAGA JUNIOR, C.G. Sobre a natureza da ramulose ou superbrotamento do algodoeiro. *Jornal de Agronomia*, São Paulo, 2: 151-60, 1939.
- CRUZ, B. P.B.; SILVEIRA, A.P. da; ABRAHÃO, J.; SILVEIRA, S.G.P.da. Comportamento de variedades de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) com vistas aos fungos *Colletotrichum gossypii* South e *Rhizoctonia solani* Kuehn., causadores do estiolamento das sementeiras. *O Biológico*, São Paulo, 36: 221-28, 1975.
- DUDIENAS, C. Caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* SOUTH e *Colletotrichum gossypii* SOUTH var. *cephalosporioides* COSTA E FRAGA J.R. Piracicaba, 1990. 67p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.; BARROW, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, 61: 42-4, 1971.
- FAURE, M.; DUPOUEY, P.; MORELEC, M.J. Les techniques de l'immunofluorescence et les reactions immunoenzymatiques. Paris, Maloine, 1977. 566p.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33: 9-15, 1967.
- FIGUEIREDO, M.B.; ALVA, A.P.C.; OLIVEIRA, A.R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatogênicos *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 3: 233-59, 1977.
- FOLLIN, J.C. Sur les différentes formes de *Glomerella* Spaul et Schr. et de *Colletotrichum* Cda. isolées du cotonnier. I. Localisation et étude morphologique. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, 24: 337-43, 1969.

- FOLLIN, J.C. & MANGANO, V. Étude sur la ramulose du cotonnier. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, 38: 209-15, 1983.
- FOLLIN, J.C. & MANGANO, V. La désinfection des semences du cotonnier au Paraguay. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, 42: 237-44, 1987.
- FRIES, N. The chemical environment for fungal growth. 3. Vitamins and other organic growth factors. In: AINSWORTH G.C. & SUSSMAN, A.S., ed. *The fungi; an advanced treatise*. New York, Academic Press, 1965, vol. 1: *The fungal Cell*, cap. 19, p.491-523.
- GENDLOFF, E.H.; RAMSDELL, D.C.; BURTON, C.L. Fluorescent antibody studies with *Eutypa armeniacae*. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 760-4, 1983.
- GOULART, A.C.P. Efeito do tratamento químico de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) no controle de fungos causadores de tombamento *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13: 110, 1988.
- GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. New York, John Wiley, 1981. 383 p.
- HINGAND, L.; LE COZ, S.; KERLAN, C.; JOVAN, B. Application de l'immunofluorescence à la détection de *Phoma exigua* var. *foveata*, agent de la gangrène de la pomme de terre. *Agronomie*, Paris, 3: 52-6, 1983.
- JOHNSON, M.C.; PIRONE, T.P.; SIEGEL, M.R.; VARNEY, D.R. Detection of *Epichloë typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 647-50, 1982.
- JULIATTI, F.C.; BUENO, J.T.; LOPES, M.E. B.M.; OUCHI, S.; HIRAI, L.T. Emergência de plântulas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e incidência de fungos em sementes tratadas com fungicidas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 12: 154, 1987.

- KATAN, T. & KATAN, J. Vegetative - compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology*, St. Paul, 78: 852-5, 1988.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, St. Paul, 44: 693-95, 1954.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. [sensu ARX, 1957]. Piracicaba, 1975, 103p. (Livre-Docência-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.).
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro. In: GALLI, F., coord. Manual de fitopatologia. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2., p.29-48.
- KUMAR, CH.R. & SUBRAMANIAN, D. Studies on *Fusarium* wilt of cotton. III. Role of gossypol in disease resistance. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 99: 193-204, 1980.
- LANKOW, R.K.; WOODHEAD, S.H.; PATTERSON, R.J.; MASSEY, R.; SCHOCHETMAN, G. Monoclonal antibody diagnostics in plant disease management. *Plant Disease*, St. Paul, 68: 1100-1, 1984.
- LEITE, A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 143-6, 1975.
- LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa, 1981. 47p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).
- MACHADO, J.C. & SILVA, S.M. Avaliação adicional da eficiência de fungicidas no controle de fungos causadores de "tombamento" de plântulas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) a partir de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13: 119, 1988.

- MADOSINGH, C. A serological comparison of three *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 42: 1143-5, 1964.
- MALAGUTTI, G. La escobilla del algodón en Venezuela. *Agronomia Tropical*, Maracay, 5: 73-83, 1955.
- MARSH, P.B.; GUITRIE, L.R.; BOLLENBACHER, K.; HARREL, D.C. Observations on microbiological deterioration of cotton fiber during the period of boll opening in 1949. *Plant Disease Reporter*. St. Paul, 34: 165-75, 1950.
- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. & KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Gold. "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 1: 57-66, 1976.
- MERZ, W.G.; BURRELL, R.G.; GALLEGLY, M.E. A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, St. Paul, 59: 367-70, 1969.
- MITCHELL, L.A. A sensitive dot immunoassay employing monoclonal antibodies for detection of *Sirococcus strobilinus* in spruce seed. *Plant Disease*, St. Paul, 72: 664-7, 1988.
- MOHAN, S.B. Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathology*, London, 37: 206-16, 1988.
- MORTON, D.J. & DUKES, P.D. Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 50: 444-5, 1966.
- OUELLETTE, G.B. & BENHAMOU, N. Use of monoclonal antibodies to detected molecules of fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, 9: 167-76, 1987.
- PATRICIO, F.R.A.; BORIN, R.B.R.G.; ORTOLANI, D.B. Tratamento químico de sementes de algodão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 14: 148, 1989.

- PIZZINATTO, M.A. Caracterização patogênica e serológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu ARX, 1957) do trigo e resistência varietal em *Triticum aestivum* L.. Piracicaba, 1981, 39p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.)
- PIZZINATTO, M.A. Tratamento de sementes de algodão. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., Campinas, 1986. Resumos. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.111-6. PIZZINATTO, M.A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S., ed. *Patologia de Sementes*. Campinas, Fundação Cargill, 1987, p. 331-46.
- PIZZINATTO, M.A.; CIA, E; FUZZATTO M.G. Estudos preliminares sobre a transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodão e sua disseminação em campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13: 111, 1988.
- PONTECORVO, G; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; Mc. DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, New York, 5: 141-238, 1953.
- PRICE, T.V. Serological identification of *Eutypa armeniacae*. *Australian Journal of Biological Sciences*, East Melbourne, 26: 389-94, 1973.
- PROGNOSTICO 87/88, São Paulo, 16: 79-87, 1987.
- PUHALLA, J.E. & SPIETH P.T. Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Experimental Mycology*, San Diego, 7: 328- 35, 1983.
- SATO, A.S.; NAKAMURA, K.; BANZATTO D.A.; KRONKA, S.N. Efeito do tratamento de sementes com alguns fungicidas no controle do damping-off do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). *Científica*, São Paulo, 2: 175-80, 1974.
- SEELIGER, H.P.R. Serology as an aid to taxonomy. In: AINSWORTH G.C. & SUSSMAN, A.S., ed. *The fungi; an advanced treatise*, New York, Academic Press, 1968. vol. 3: The fungal population, cap. 23, p.597-624.

- SKILLING, D; KIENZLER, M; HAYNES, E. Distribution of serological strains of *Gremmeniella abietina* in eastern North America. *Plant Disease*, St. Paul, 68: 937-38, 1984.
- SOUTHWORTH, E.A. Anthracnose of cotton. *Journal of Mycology*, Columbus, 6: 100-5, 1891.
- TANAKA, M.A.S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. Piracicaba, 1990. 111p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- TANAKA, M.A.S. Problemas da detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M., e do Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991, cap. I, p. 93-108.
- ULLSTRUP, A.J. Variability of *Glomerella gossypii*. *Phytopathology*, St. Paul, 28: 787-98, 1938.
- WATKINS, G.M. *Compendium of cotton diseases*. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1981. 87p.
- WHITE, D.G. The preparation and use of a fluorescent antibody reagent for the detection of *Pythium graminicola*. *Phytopathology*, St. Paul, 66: 523-5, 1976.
- WILKINSON, J.H. *Isoenzymes*. London, Chapman & Hall, 1970. 369p.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Diferenças mínimas significativas e níveis de probabilidade pelo teste Tukey, utilizadas nas comparações nas diferentes tabelas.

Tabela	Média comparada	Nível probabilidade (%)	DMS
7	Doses	1	1.247
	Isolados	1	2.613
	Isolados dentro de doses	1	5.225
	Doses dentro de isolados	1	4.319
8	Doses	5	0.528
	Isolados	5	0.372
	Isolados dentro de doses	10	0.565
9	Isolados (x)	10	3.294
	$(\sqrt{x + 0.5})$	10	0.738
16	Fungicidas	10	1.287
	Fungicidas dentro de doses	5	10.360
17	Isolados	10	2.133b