



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO A  
*Ramularia areola* E VARIABILIDADE MOLECULAR DO  
PATÓGENO**

**VALESKA SILVA LUCENA**

**NATAL-RN  
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO ALGODOEIRO A  
*Ramularia areola* E VARIABILIDADE MOLECULAR DO  
PATÓGENO**

**VALESKA SILVA LUCENA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientadora: Dra. Lúcia Vieira Hoffmann**

**Co-orientador: Dr. Nelson Dias Suassuna**

**NATAL-RN**

**2007**

## DEDICATÓRIA

A Deus, que foi não só a luz que guiou o meu caminho, como também o meu sustento em todos os tropeços...

Aos meus pais Marluce e Porto, que mesmo com todas as dificuldades, conduziram-me pelo caminho certo, obrigada por tudo...

Aos meus irmãos Viviane e Dráulio, a Junior e a todos os meus familiares por todo amor e apoio prestado por todo este tempo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao FACUAL – Fundo de Apoio a Cultura do Algodão – pelo apoio financeiro a toda a parte experimental.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e a todos os professores, por toda a sabedoria transmitida.

Em especial a Dra. Lúcia Vieira Hoffmann, minha orientadora, pelas sugestões e todo o auxílio na condução deste trabalho, tenho certeza que nem ela sabe o quanto foi especial nessa jornada.

Ao meu Co-orientador Dr. Nelson Dias Suassuna, ao Dr. Marc Giband, Dr. Paulo Barroso e Dr. Wirton M. Coutinho, pela paciência e ajuda na elaboração do projeto, na condução dos experimentos e pelas sugestões na dissertação.

Aos meus amigos do laboratório de Biotecnologia Fábria Sueli, seu Francisco e José Carlos Porangaba, pela ajuda e paciência em ensinar...

Aos meus amigos, Carol, Milena, Rafaela, Ivan, Guilherme, Kathyucia e Diva pela oportunidade de dividir problemas e resolvê-los juntos.

A todos do laboratório de Fitopatologia em especial a Cíntia pela ajuda nos experimentos.

A Dr. José Wellington dos Santos, pela disponibilidade desde a inscrição do mestrado até a dissertação final.

A Dra. Julita M. F. C. Carvalho pelo auxílio na graduação e pelos incentivos para ingressar no mestrado.

A Dr. Raul Porfírio por todo o auxílio prestado para a dissertação e no desenvolvimento da apresentação.

Aos colegas da turma de pós-graduação Cíntia, Vanessa, Leonardo, Rodrigo Givanilson, Thiago, Cristiane, Jales, Ingrid, Lorena, Lourena, Viviane, Matheus e Leonã; pela amizade, troca de conhecimentos e ajuda prestada.

# Caracterização da resistência do algodoeiro a *Ramularia areola* e variabilidade molecular do patógeno

## RESUMO

Este estudo teve como objetivos estudar a estrutura genética e patogênica de isolados de *Ramularia areola* do Brasil e caracterizar a resposta de resistência no algodoeiro à mancha-de-ramulária. Foi avaliada a variabilidade genética de 28 isolados do patógeno, utilizando-se marcadores RAPD. A avaliação da patogenicidade de 6 desses isolados foi realizada após a inoculação nas variedades Guazuncho-2 (*Gossypium hirsutum*) suscetível e VH8-4602 (*Gossypium barbadense*) resistente à doença. A herança da resistência no algodoeiro à doença foi caracterizada pela medição de intensidade da doença nas variedades Guazuncho-2 (*G. hirsutum*), suscetível, e VH8-4602 (*G. barbadense*), resistente à doença, e nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento entre elas. O polimorfismo molecular entre as linhagens de *G. hirsutum* DeltaOpal e CNPA CO-11612, contrastantes fenotipicamente quanto à resistência à doença foi avaliado utilizando-se 118 marcadores SSR e 24 AFLP. Para mapeamento molecular dos genes de resistência, linhagens recombinantes RIL's derivadas do cruzamento entre Guazuncho-2 e VH8-4602 foram genotipadas utilizando marcadores SSR. A análise da estrutura da população de *R. areola* revelou que as três subpopulações foram semelhantes geneticamente ( $G_{st}=0.18$ ). Os isolados de Goiás e Minas Gerais obtiveram maior similaridade genética (0,92), que pode estar associada com o alto fluxo genético existente entre as subpopulações que foi de ( $N_m=2.20$ ). Quanto à patogenicidade, os isolados de *R. areola* 9.1, coletado no estado de Minas Gerais, 8.2 e 8.3 de Goiás, foram mais agressivos na variedade suscetível Guazuncho-2. A variedade VH8-4602 apresentou alto nível de resistência à doença. Não foi observada interação diferencial entre os patógenos e as variedades analisadas, sendo a resistência classificada como horizontal. Na análise dos indivíduos das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, provenientes do cruzamento entre Guazuncho-2 e VH8-4602, a quantificação de sintomas da doença através da contagem de manchas necróticas e pelo número de esporos mostrou variação contínua da resistência à doença nos indivíduos da geração F<sub>2</sub>, indicando que a herança é poligênica. O aparecimento de sintomas e esporulação nos indivíduos F<sub>1</sub> mostrou que a resistência é recessiva. O polimorfismo molecular entre as linhagens de *G. hirsutum*, DeltaOpal e CNPA CO-11612 foi de 6%, portanto baixo, para realizar o mapeamento. Durante genotipagem das RIL's foi verificado que 25% dos marcadores segregaram de acordo com as proporções das leis de Mendel, e 75% desses marcadores apresentaram distorção de segregação, com aumento da proporção de genes do parental *G. hirsutum*. A baixa variabilidade do patógeno e número de genes de resistência sugere que a resistência genética ao patógeno tenha alta durabilidade.

Palavras Chaves: *Gossypium*, resistência genética, marcadores moleculares

## Characterization of cotton resistance to *Ramularia areola* and molecular variability of the pathogen

### ABSTRACT

This research was conducted with the aim to study the genetic and pathogenic structure of *Ramularia areola* isolates collected in Brazil and to characterize the resistance response in cotton plants to ramularia spot. The genetic variability of 28 isolates of *R. areola* was studied using RAPD markers. The pathogenicity evaluation was realized by the inoculation of 6 isolates on cotton varieties Guazuncho-2 (*Gossypium hirsutum*) and VH8-4602 (*Gossypium barbadense*). The inheritance of disease resistance was studied using an artificially inoculated population of F<sub>2</sub> individuals derived from the intercross of Guazuncho-2 (susceptible variety) and VH8-4602 (resistant variety), and also the parents and F<sub>1</sub> individuals. Molecular polymorphism between the *G. hirsutum* varieties DeltaOpal (susceptible) and CNPA CO-11612 (resistant) was estimated by 118 SSR and 24 AFLP markers. The parental genotypes Guazuncho-2 and VH8-4602 were selected for mapping, and then Recombinant Inbred Lines (RIL's) derived from this crossing were evaluated with SSR 12 markers. The analysis of population structure of *R. areola* revealed that the three subpopulations were genetically similar ( $G_{st}=0.18$ ), and the isolates from Goiás and Minas Gerais were more similar to each other (0,92). This probability can be related to the relatively high gene flow among the three subpopulations ( $N_m=2.20$ ). The isolates *R. areola* 9.1, from Minas Gerais State and 8.1 and 8.3 from Goiás State were the most aggressive ones to the susceptible variety Guazuncho-2. The variety VH8-4602 presented high level of resistance to ramularia spot. No differential interaction was observed between the pathogens and the analyzed varieties, and the resistance was classified as horizontal. The quantification of disease by number of necrotic lesions and number of spores in individual plants of F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations from the crossing between the varieties Guazuncho-2 and VH8-4602 presented continuous distribution, suggesting polygenic resistance. The resistance is probably recessive, since necrotic lesions and sporulation were observed on F<sub>1</sub> plants. The molecular polymorphism between DeltaOpal e CNPA CO-11612 lineages was low (6%), then would be difficult to accomplish molecular mapping of disease resistance using this intercross. With the genotyping of the RIL's it was verified that 25% of the markers segregated in the proportions proposed by Mendel's Law and 75% of the studied markers presented segregation distortion in favor to the parental *G. hirsutum*. Both the low genetic variability of the pathogen and the number of resistance genes suggest that durable genetic resistance may be achieved.

Key words: *Gossypium*, resistance genetic, markers molecular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Relação taxonômica do gênero <i>Gossypium</i> .....	2
<b>Figura 2:</b> Forma de expressão de um gene de resistência.....	11
<b>Figura 3:</b> Classes de proteínas dos genes de resistência.....	11
<b>Figura 4:</b> Polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO-11612 identificado com o marcador CIR 364.....	30
<b>Figura 5:</b> Perfil de AFLP obtido com os <i>primers</i> EAAC+MCAA entre DeltaOpal e CNPA CO-11612. A seta indica a banda polimórfica presente em CNPA CO-11612 e ausente em DeltaOpal.....	31
<b>Figura 6:</b> Esporulações observadas nas cultivares Guazuncho-2 (à esquerda) e VH8-4602 (à direita).....	36
<b>Figura 7:</b> Exemplo de morte celular observada em plantas F <sub>2</sub> .....	43
<b>Figura 8:</b> Exemplo de esporulação de <i>R. areola</i> observada em plantas F <sub>2</sub> .....	43
<b>Figura 9:</b> Polimorfismo entre Guazuncho-2 e VH8-4602 identificado com os marcadores SSR CIR 109 (superior) e NAU 864 (inferior).....	44
<b>Figura 10:</b> Perfil de bandas amplificadas em gel de poliacrilamida usando os marcadores co-dominantes BNL 3103 e BNL 1414 na população segregante RIL's.....	46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Freqüência alélica de 44 locos RAPD em três subpopulações de *Ramularia areola*.....33
- Tabela 2:** Identidade genética de Nei (diagonal acima) e distância genética (diagonal abaixo) nas subpopulações de *R. areola*.....34
- Tabela 3:** Número médio de pontos necróticos entre os isolados de *R. areola* observado em Guazuncho-2.....35
- Tabela 4:** Número médio de pontos necróticos entre os isolados de *R. areola* observado em VH8-4602.....35
- Tabela 5:** Número médio de esporos entre os isolados de *R. areola* para as cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602.....36
- Tabela 6:** Valores médios dos tratamentos comuns (Guazuncho-2 e VH8-4602) e ajustados para as plantas ( $F_1$  e  $F_2$ ) referentes à variável esporulação.....38
- Tabela 7:** Valores médios dos tratamentos comuns (Guazuncho-2 e VH8-4602) e ajustados, para as plantas ( $F_1$  e  $F_2$ ) referentes à variável esporulação.....40

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Levantamento das regiões do Brasil destinadas a produção do algodão..4
- Gráfico 2:** Levantamento das áreas por regiões do Brasil destinadas a produção do algodão.....5
- Gráfico 3:** Distribuição do número de plantas em função do número de esporos.....42
- Gráfico 4:** Composição alélica observada por loco.....47
- Gráfico 5:** Composição alélica observada por loco.....47

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Identificação dos isolados de <i>Ramularia areola</i> .....	24
<b>Quadro 2:</b> <i>Primers</i> que geraram bandas polimórficas entre DeltaOpal e CNPA CO-11612.....	30
<b>Quadro 3:</b> <i>Primers</i> AFLPs polimórficos, número total de locos e número de locos polimórficos entre as linhagens DeltaOpal e CNPA CO-11612.....	31
<b>Quadro 4:</b> Relação de <i>primers</i> selecionados por cromossomo.....	45
<b>Quadro 5:</b> Teste do qui-quadrado das frequências observadas.....	46
<b>Quadro 6:</b> Frequência do alelo A ( <i>G. hirsutum</i> ) e do alelo B ( <i>G. barbadense</i> ) de algumas RIL's.....	48

## LISTA DE ABREVIações

ADE: Água destilada esterilizada

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado

ATP: Adenosina trifosfato

AVR: Avirulência

BOD: *Biological oxygen demand*

CIRAD: Centro de cooperação internacional em estudos para o desenvolvimento agrônômico

cM: centiMorgan

DNA: Ácido desoxyribonucléico

dNTP: Desoxynucleosídeo trifosfato

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

EMBRAPA: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

GTP: Guanina trifosfato

H: Diversidade gênica ou heterozigosidade

H<sub>s</sub>: Diversidade genética intrapopulacional

H<sub>t</sub>: diversidade genética total

LRR: *Leucine Rich Repeats* ou Repetições ricas em leucina

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* ou Adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato

NB: *Binding Nucleotide* ou Nuceotídeo de ligação

N<sub>m</sub>: Número de migrantes

PAL: *Phenylalanine Ammonia Lyase* ou Phenylalanina amonia liase

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Pattern* ou Modelos moleculares associados ao patógeno

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, ou Reação de polimerase em cadeia.

PopGene: Population genetic analysis

QTL: *Quantitative Trait Loci*, ou Loco de característica quantitativa

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*, ou Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RC: Retrocruzamento

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RH: Resposta hipersensitiva

RIL: *Recombinant Inbred Line*, ou Linhagem recombinante

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SSD: *Single Seed Descendent*

SSR: *Simple Sequence Repeat*, ou Microssatélites

TBE: Tris borato EDTA

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE QUADROS .....	ix
LISTA DE ABREVIações.....	x
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 O algodoeiro.....	2
2.2 A mancha-de-ramulária.....	6
2.3 O patógeno.....	6
2.4 Variabilidade molecular de fungos.....	7
2.5 Táticas de manejo.....	8
2.6 Interação planta-patógeno.....	9
2.6.1 Resposta hipersensitiva.....	12
2.6.2 Classificação epidemiológica da resistência.....	13
2.6.3 Genética da resistência ao patógeno.....	14
2.7 Marcadores moleculares.....	16
2.7.1 Classes de marcadores moleculares.....	17
2.7.1.1 RAPD (Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso).....	17
2.7.1.2 SSR (Microsatélites).....	18
2.7.1.3 AFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado).....	18
2.8 Mapa genético do algodão .....	18
3.0 OBJETIVOS .....	22
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Material vegetal .....	23
4.2 Obtenção dos isolados de <i>Ramularia areola</i> .....	24
4.2.1 Isolamento de <i>R. areola</i> .....	25
4.2.2 Esporulação de <i>R. areola</i> .....	25
4.3 Plantio e inoculação das plantas .....	25
4.3.1 Inoculação para estudo de herança de resistência a doença.....	26

4.3.2 Inoculação para o teste de variabilidade patogênica dos isolados de <i>R. areola</i>	26
4.4 Avaliação dos ensaios .....	26
4.5 Extração do DNA do algodão .....	27
4.6 Extração do DNA dos fungos .....	27
4.7 Obtenção dos marcadores RAPD .....	27
4.7.1 Quantificação da variabilidade genética dos isolados .....	28
4.8 Obtenção dos marcadores microssatélites (SSR) .....	28
4.9 Obtenção dos marcadores AFLP .....	29
5.0 RESULTADOS .....	30
5.1 Avaliação do polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO-11612 .....	30
5.2 Diversidade genética dos isolados de <i>Ramularia areola</i> .....	32
5.3 Estudo da agressividade de isolados de <i>R. areola</i> .....	34
5.4 Caracterização da herança do algodoeiro a <i>R. areola</i> .....	37
5.5 Genotipagem das RIL's .....	44
6.0 DISCUSSÃO .....	49
7.0 CONCLUSÕES .....	55
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## 1.0 INTRODUÇÃO

O algodoeiro pertencente ao gênero *Gossypium* é uma das mais importantes culturas em todo o mundo, pelo seu valor econômico e social. Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem, na indústria de alimentação animal (farelo) e humano (óleo), além de amplo número de produtos secundários, apresentando grande importância socioeconômica.

Nos últimos anos houve aumento da produção do algodão no Brasil, cujas estimativas de produções para o ano de 2007 perfaz um total de 3,6 milhões de toneladas, significativamente maior em 24,5%, que a produção de 2006 que atingiu 2,9 milhões de toneladas. Essa expansão vem ocorrendo tanto no Cerrado, com cultivos mecanizados em grandes áreas, quanto no Nordeste brasileiro, onde essa cultura abrange grande quantidade de mão-de-obra familiar.

Entretanto às condições ambientais como relevo, solo e precipitações que favorecem a produção do algodoeiro na região do Cerrado, também vem favorecendo a incidência de algumas doenças fúngicas, entre a mancha-de-ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* essa doença provoca lesões na folha levando a uma redução da área foliar fotossintetizante e conseqüentemente redução de produção.

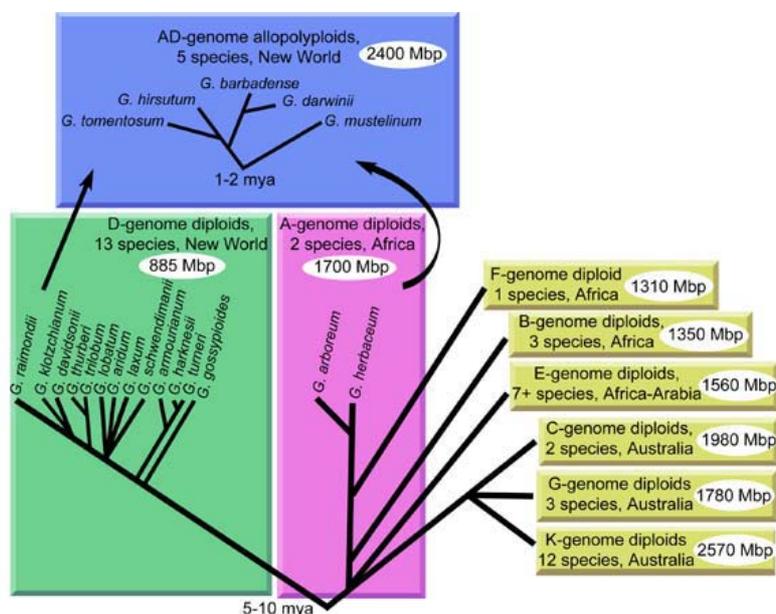
As cultivares em uso atualmente não possuem um nível de resistência adequado, e aplicações de fungicidas são necessárias para conter a doença, que causa desfolha precoce e diminui a produção, entretanto essa medida de contenção da doença aumenta os custos de produção. Portanto a tática de manejo mais aceitável encontra-se no emprego de cultivares resistentes.

Até o momento não há estudos no Brasil que forneçam subsídios para viabilizar o uso estratégico da resistência e realizar estratégias de melhoramento voltadas à obtenção de genótipos resistentes. Portanto, propõe-se caracterizar a resistência do algodoeiro a mancha-de-ramulária e estudar a variabilidade molecular e patogênica do agente causal, além de utilizar marcadores moleculares para iniciar o mapeamento de genes de resistência a *R. areola*.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O algodoeiro

O algodoeiro é uma planta da família *Malvaceae*, pertencente ao gênero *Gossypium*. Esse gênero abrange 50 espécies, destas 45 são diplóides ( $2n=2x=26$ ) e 5 são alotetraplóides ( $2n=4x=52$ ) (FRYXELL, 1992; PERCIVAL et. al., 1999; ULLOA et. al., 2006). Essas espécies são agrupadas em nove tipos de genomas designadas por A, B, C, D, E, F, G, K e AD (PERCIVAL et. al., 1999). As relações evolutivas dessas espécies indicam que as alotetraplóides, designadas AD, surgiram a partir do cruzamento interespecífico de uma espécie de genoma diplóide A com outra D (BEASLEY, 1940 e HARLAND, 1940, citado por BELTRÃO, 1999).



**Figura 1:** Relação taxonômica do gênero *Gossypium*  
Fonte: <http://www.eeob.instate.edu/faculty/wendel/home.htm>

Embora trocas de genomas bidirecionais entre *G. hirsutum* e *G. barbadense* tenham sido documentadas (BRUBAKER e WENDEL, 2001), tentativas de recombinação convencional interespecífica entre as duas espécies tiveram um

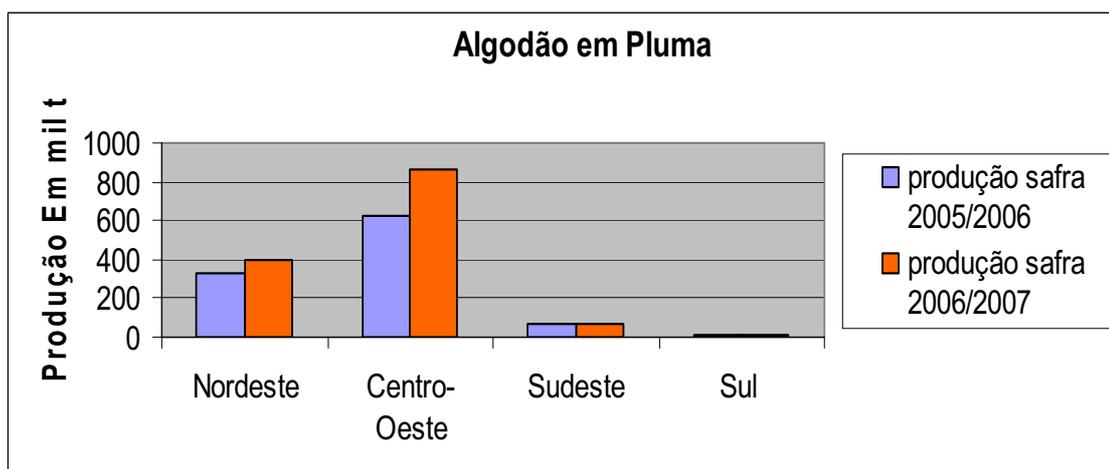
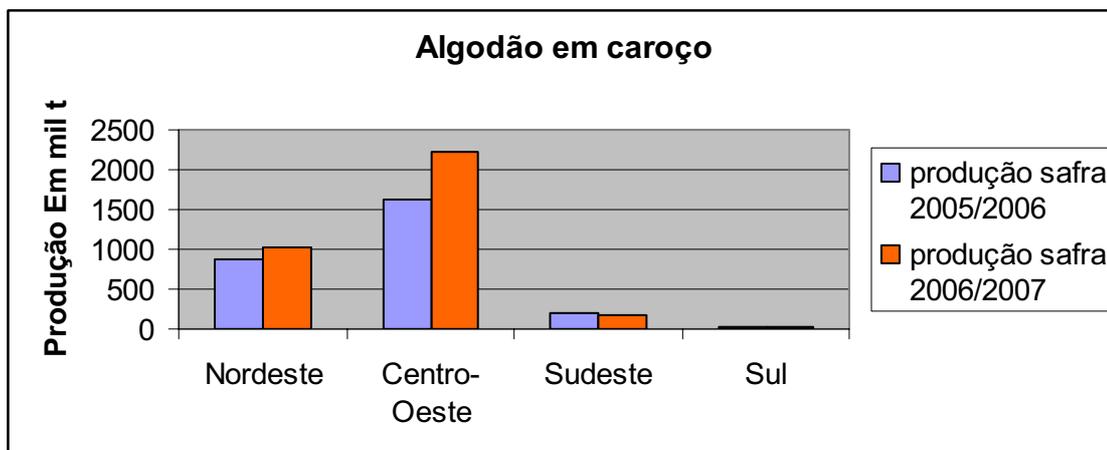
impacto limitado no desenvolvimento de cultivares (PATERSON e SMITH,1999, citado por LACAPE et. al., 2005).

Das espécies cultivadas quatro têm importância econômica. *G. hirsutum* L., tetraplóide, originária do México, responsável por 90% da produção mundial de fibras; *G. barbadense* L., tetraplóide, proveniente do Peru, que produz fibras longas e extras-longa, sendo a segunda espécie mais cultivada, responsável por 5% da produção mundial; as espécies diplóides, *G. arboreum* L e *G. herbaceum* L. provenientes da África, que abrangem, em conjunto, 5% da produção (BOLEK, 2005).

No mundo quase todos os países produzem algodão, consumindo cerca de 20 milhões de toneladas desta cultura por ano (BELTRÃO, 1999). Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e na indústria de alimentação animal (farelo) e humano (óleo), além de amplo número de produtos secundários.

Uma estimativa da produção brasileira do algodão para o ano de 2007 perfaz um total de 3,6 milhões de toneladas, significativamente maior em 24,5% que a obtida em 2006 (2,9 milhões de toneladas) (Gráfico 1). Essa variação positiva deveu-se à recuperação dos preços do produto no mercado brasileiro e externo, tendo em vista que a produção mundial da safra 2006/2007 está estimada em volumes inferiores à demanda, com a conseqüente redução nos estoques de passagem. Esta situação sugere uma perspectiva de incremento das exportações brasileiras e a este fator, somam-se as previsões favoráveis das condições climáticas, resultando em quadro positivo e aumento da produção nacional (CONAB, 2007).

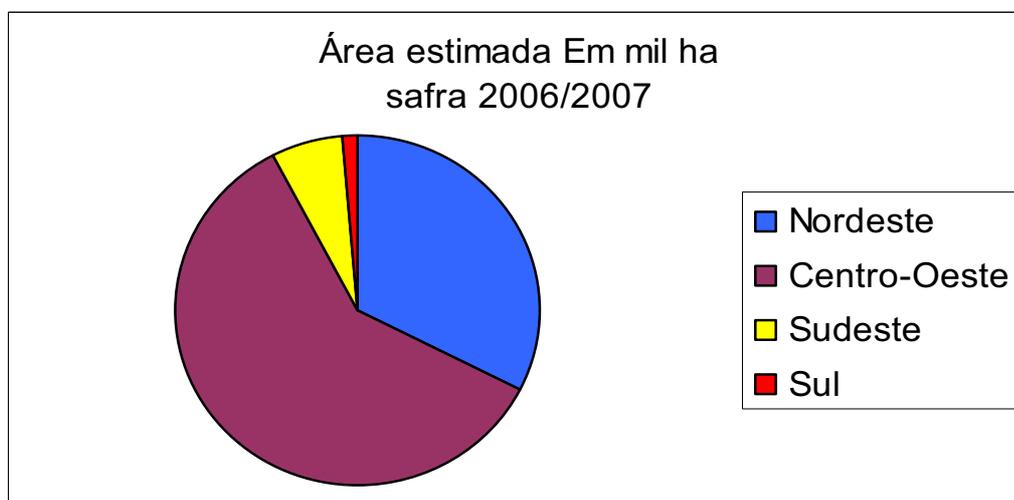
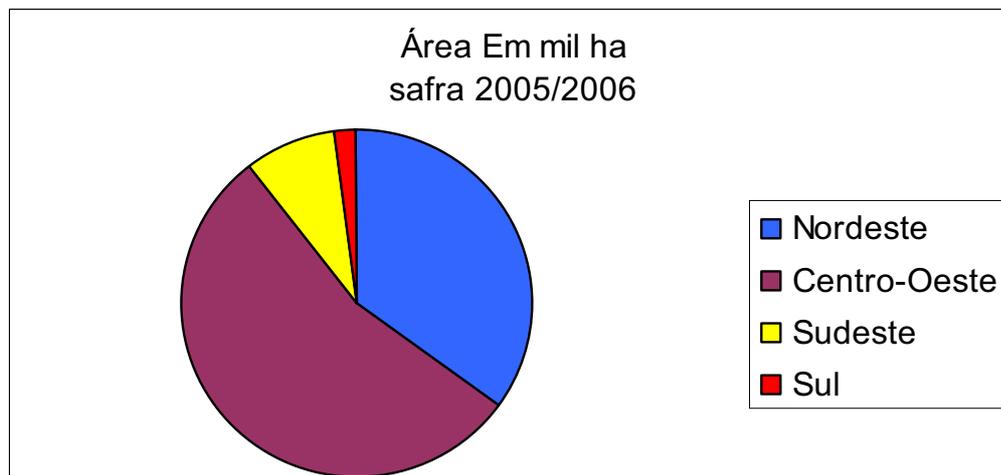
**Gráfico 1:** Levantamento das regiões do Brasil destinadas a produção do algodão (CONAB, 2007).



Após a introdução do bicudo e a abertura de mercado nos anos 80, houve grande decréscimo na área plantada com algodoeiro nos lugares onde seu plantio foi tradicional, especialmente na região semi-árida do Nordeste brasileiro. A retomada da produção ocorreu na região Centro-Oeste, principalmente nos estados de Goiás e Mato Grosso, devido às boas condições que essas regiões apresentam para o seu cultivo, como relevo, solo e precipitações. Nessas regiões o cultivo é realizado principalmente em grandes propriedades com alta tecnologia de produção (FREIRE, 1998). No Nordeste brasileiro, a produção se concentra principalmente no estado da Bahia, em sua área de Cerrado. Nos outros estados a cultura é representada pela utilização de altos contingentes de mão-de-obra e importante fonte de renda nas pequenas propriedades (FREIRE, 1998). No gráfico 2 observa-se

que a região Centro-Oeste destina uma maior área à produção do algodão seguida pela região Nordeste.

**Gráfico 2:** Levantamento das áreas das regiões do Brasil destinadas a produção do algodão (CONAB, 2007)



Entretanto, as mesmas condições climáticas da região Centro-Oeste, que favorecem o cultivo do algodoeiro como, altos índices pluviométricos, temperaturas diurnas elevadas e noturnas amenas vêm favorecendo o desenvolvimento de doenças fúngicas dentre elas a mancha-de-ramulária (MARANHA et. al., 2002).

## 2.2 A mancha-de-ramulária

No Brasil, até algum tempo atrás, esta doença era considerada um problema fitossanitário secundário, ocorrendo apenas no final do ciclo da cultura do algodoeiro. Porém, nos últimos anos, com o aumento da área cultivada de algodão no cerrado e o uso de cultivares suscetíveis, a doença passou a surgir mais cedo e, com isto, aumentou a quantidade de perdas causadas, sendo considerada, hoje, a principal enfermidade da cultura nesta região, com perdas estimadas em 30% da produção (UTIAMADA et. al., 2003).

Entretanto, pode-se notar que o potencial de dano desta doença pode ser ainda maior, pois, em países como Madagascar e Índia, ela já foi responsável por perdas acima de 60% da produção em algumas safras (CAUQUIL e SÉMENT, 1973; SHIVANKAR e WANGIKAR, 1992).

Como muitas doenças de plantas, a mancha-de-ramulária possui diferentes designações nas diferentes regiões em que ocorre. Na América do Sul ela é conhecida por mancha branca, sendo também chamada por míldio cinza na Índia, ou míldio areolado ou falso míldio nos Estados Unidos (EHRLICH e WOLF, 1932).

Esta doença é causada pelo fungo *Ramularia areola* e inicia-se com lesões pequenas (3-4 mm de largura) com formato angular de coloração verde claro na superfície superior da folha; mas, na superfície inferior, a esporulação abundante dá à lesão uma cor esbranquiçada. Sob condições de alta umidade o fungo também esporula na face superior da folha. Uma vez cessada a esporulação ativa, as lesões tornam-se necróticas, de cor marrom escuro, acarretando perda da área foliar fotossintetizante e conseqüentemente redução de produção (HOLEY et. al., 1992).

## 2.3 O patógeno

*R. areola* se desenvolve em três fases distintas durante seu ciclo de vida, com um estágio conídial em tecidos vivos, o espermogônial que acontece em folhas senescentes e é seguido pelo estágio ascógeno que se desenvolve em folhas parcialmente deterioradas (EHRLICH e WOLF, 1932).

A germinação dos conídios ou ascóporos ocorre a temperaturas entre 16 a 34°C com um ótimo entre 25 e 30° C. O tubo germinativo conídial forma um apressório que penetra nas células guardas, a infecção inicia-se a partir da

penetração por meio da abertura estomatal. Esse patógeno requer para germinação e penetração ciclos variando entre noites úmidas e dias quentes. Após a esporulação ocorre a destruição das células invadidas levando a uma abscisão da folha (EHRLICH e WOLF, 1932).

## **2.4 Variabilidade molecular de fungos**

Na condução de um programa de melhoramento visando à obtenção de cultivares resistentes, bem como para desenvolver estratégias sustentáveis de manejo de doenças, é necessário entender o controle genético da reação ao patógeno e estudar a dinâmica populacional (COOKE e LEES, 2004). A associação das informações de tipo de reação da planta e estrutura e evolução das populações do patógeno podem prever como estes vão se desenvolver frente aos diferentes métodos de controle (ALFONSO et. al., 2000). Portanto deve-se verificar se existe variabilidade genética entre os isolados, identificar germoplasmas que possuam os genes de resistência procurados no hospedeiro, e posteriormente incorporar esses genes em cultivares comerciais por meio dos métodos de melhoramento, e também buscar estratégias para que a resistência seja durável face à natureza dinâmica das populações de patógenos (CAMARGO e BERGAMIN FILHO, 1995).

Estrutura genética refere-se à quantidade e a distribuição de variação genética dentro e entre populações (McDONALD, 1997), sendo o resultado de interações entre as forças seletivas que atuam na evolução. Entende-se por população “um conjunto de indivíduos que co-existem no tempo e no espaço (em um mesmo campo) sujeitos às mesmas forças seletivas” (SUASSUNA, 2005).

Vários marcadores são utilizados para determinar a estrutura genética de populações, estimando a diversidade genética total ( $H_t$ ), a diversidade genética dentro das populações ( $H_s$ ) e entre populações ( $G_{st}$ ). Os primeiros marcadores utilizados para esse tipo de análise foram os RFLP, posteriormente também foram usados AFLP e RAPD (PÉROS e BERGER, 2003).

O conhecimento da variabilidade entre e dentro de populações é um componente importante na compreensão do sucesso evolutivo do patógeno. Uma grande diversidade genética distribuída numa pequena área espacial sugere a possibilidade de rápida adaptação a mudanças ambientais. Alta similaridade genética entre as populações coletadas de regiões geográficas separadas sugere a

ocorrência de dispersão a longa distância e fluxo gênico, aumentando o nível de risco do patógeno (MCDONALD et. al., 1999 citado por BEZERRA, 2007)

O fluxo gênico pode ser quantificado a partir de medidas diretas e indiretas. Entre os métodos indiretos estão aqueles via  $F_{st}$  de Wright (1951) que é equivalente ao coeficiente  $G_{st}$  de Nei (1973), mais tarde Nei (1987) propôs a seguinte fórmula para calcular o  $G_{st}$  com base no  $H_t$  e  $H_s$  :

$$G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

A probabilidade de dois genes escolhidos aleatoriamente serem idênticos ou não idênticos pode ser dada pela identidade gênica ou homozigosidade ( $J$ ) e pela medida da variação gênica de uma população ( $H$ ) geralmente chamada de heterozigosidade ou diversidade gênica. A diversidade gênica máxima é 1, o valor de  $H$  é dado pela fórmula:  $H = 1 - J$ , em que a variação gênica da população estudada é igual a 1 menos o valor da identidade genética encontrada nesta população (NEI, 1973)

## 2.5 Táticas de manejo

Dentre as alternativas para controle da mancha-de-ramulária está o uso de defensivos químicos, nesse caso é fundamental o monitoramento da lavoura para identificação das primeiras lesões, ponto este ideal para aplicação de fungicidas, retardando o início da epidemia e impedindo o aumento do inóculo no campo (MIRANDA e SUASSUNA, 2004). Contudo, o uso intensivo desses defensivos onera os custos de produção e são realizados por poucos grupos químicos (estrobilurinas, triazóis e benzimidazóis) com modo de ação muito específico e com grande risco de induzir populações resistentes do patógeno. Outra opção é o uso de cultivares geneticamente resistentes (MARANHA et. al., 2002).

No caso específico do patossistema algodoeiro – mancha-de-ramulária existe considerável variação no grau de suscetibilidade a esta doença nas diferentes cultivares pertencentes ao gênero *Gossypium* (*G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum* e *G. herbaceum*), tornando-se viável a seleção de genótipos com características agronômicas desejáveis e resistentes à enfermidade. Entretanto, apesar de haver várias publicações sobre o tema, as condições de inoculação e critérios para avaliação da doença podem gerar resultados aparentemente contraditórios. Em *G. hirsutum*, segundo Dake e Kannan (1982), a maioria das

cultivares é altamente suscetível à doença; todavia, existem variedades resistentes à mancha-de-ramulária como, por exemplo, as variedades Laxmi e MCU-5. Segundo Rathaiah (1976) as cultivares BJA-592 e Reba BTK-12 de *G. hirsutum* e Tadla-16 e Pima-67 de *G. barbadense*, reagiram à inoculação de quatro isolados de *R. areola*, oriundos dos continentes africano e asiático, com uma reação de hipersensibilidade.

O programa de melhoramento da Embrapa Algodão tem selecionado genótipos com alta resistência, como as linhagens CNPA CO-11612 e CNPA GO-2984 e com resistência moderada, como a cultivar BRS Buriti\*.

Alguns fatores morfológicos e bioquímicos parecem atuar na resposta da resistência do algodoeiro a *R. areola*. São apontados como possíveis fatores morfológicos e anatômicos que conferem resistência do algodão contra *R. areola*: espessura da cutícula e da parênquima paliçádico, proporção de estômatos ou fatores histoquímicos (PUNIT MOHAN et. al., 1997). Como fator bioquímico Charakbarty et. al., (2002) identificaram em plantas da espécie *G. arboreum*, que continham 5 a 10% de área foliar afetada pela mancha-de-remulária, maior atividade da enzima PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) comparado com folhas de plantas saudas. Uma cultivar imune de *G. arboreum* obteve maior atividade da mesma enzima quando em contato com o patógeno.

## 2.6 Interação planta - patógeno

No seu habitat natural existe um constante conflito entre micróbios patogênicos e organismos multicelulares. As defesas das plantas devem se adaptar ao combate de dois diferentes tipos de patógenos. Os necrotróficos, que são aqueles patógenos que produzem enzimas tóxicas e metabólitos que matam o tecido diretamente após a invasão; e o hemibiotróficos e biotróficos que são aqueles que se alimentam da planta parasitada, mantendo a célula infectada viva, na qual o patógeno, completa seu ciclo de vida. O número de diferentes componentes tóxicos e proteínas que vêm sendo isolado de patógenos de plantas e que contribui para a virulência são enormes (DANGL e JONES, 2001).

A coevolução entre patógeno e hospedeiro cria novos mecanismos de ataque e o hospedeiro responde com a criação de novos mecanismos de defesa. Uma vez

---

\* Comunicação pessoal do Pesquisador da Embrapa - Algodão Nelson Dias Suassuna

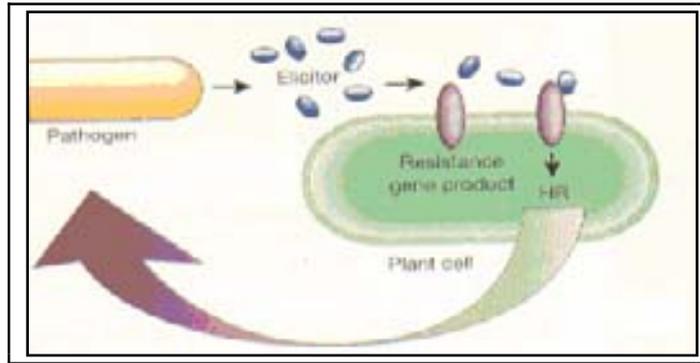
que estes mecanismos estão sob controle genético, entender a maneira pela qual genes de resistência do hospedeiro interagem com genes de virulência do patógeno é de fundamental importância para que o homem interfira eficientemente nesta batalha a favor do hospedeiro (CAMARGO, 1995).

Em cada parte da planta evoluiu um sistema de vigilância molecular que promove o reconhecimento de muitos tipos diferentes de moléculas codificadas pelo patógeno. As plantas são capazes de reconhecer estruturas altamente conservadas entre diferentes tipos de patógenos, os chamados modelos moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*), também chamados elicitores, frequentemente essenciais a seu ciclo de vida (NURNBERGER et. al., 2004).

Complicações adicionais para a planta podem surgir da capacidade que certos patógenos adquiriram de suprimir a defesa induzida pelos PAMPs, e mascarar fatores de avirulência, ou de interferir em múltiplos pontos de reconhecimento da rota de sinalização de defesa (ABRAMOVITCH e MARTIN, 2004).

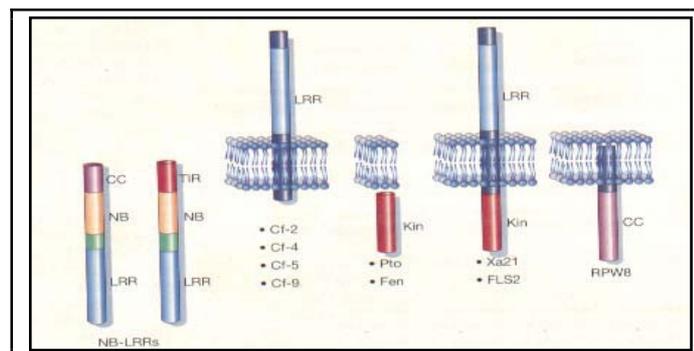
Paralelamente a este evento, as plantas também evoluíram e desenvolveram coleções de proteínas, denominadas proteínas de resistência (R), que reconhecem fatores de virulência específicos do patógeno como sinais de invasão; este fator de virulência quando é detectado pelo hospedeiro é geneticamente redefinido como fator de avirulência (Avr) (DANGL e JONES, 2001).

Os genes R das plantas podem reconhecer elicitores de bactérias, vírus, fungos e até mesmo nematóides e insetos patogênicos (HINCHIFFE et. al., 2005). Quando os genes R e os genes *avr* correspondentes estiverem presentes tanto no hospedeiro quanto no patógeno o resultado é a resistência à doença. Se um deles é inativo ou ausente, resulta em doença. O modelo de interação genética requer que os produtos dos genes R reconheçam sinais de Avr e engatilhem os eventos da cadeia de tradução de sinal que culminam na ativação dos mecanismos de defesa e numa contenção do crescimento do patógeno (DANGL e JONES, 2001). Isto é demonstrado pelo esquema da figura 2.



**Figura 2:** Forma de expressão de um gene de resistência  
 Fonte: Dangl & Jones, 2001

Apesar desta gama extensiva de patógenos e de suas moléculas efetoras de patogenicidade, os genes de R codificam proteínas com domínios similares entre si e, assim puderam ser estabelecidas cinco classes de proteínas (DANGL e JONES, 2001). Na Figura 3 está apresentado esquema de cada uma destas classes, a maioria dessas proteínas R são classificadas como NBS-LRR, essa classe pode ser posteriormente subdividida de acordo com a homologia da sua região N-terminal a receptores de genes interleucina-1 TIR (TIR-NBS-LRR), a zíper de leucina (LZ-NBS-LRR), a motivos colóides (CC-NBS-LRR), e existem ainda as proteínas que apresentam outros motivos conservados de (SER/TRN KINASE).



**Figura 3:** Classes de proteínas dos genes de resistência  
 Fonte: Dangl & Jones, 2001.

Dentre as classes de proteínas R existem as que possuem domínios transmembranas ou extracelulares de repetições ricas em leucina (LRR, de *leucine rich repeats*, como demonstra a figura 3) que funcionam como local de interação proteína-proteína, proteína-carboidrato ou de sítio de ligação a peptídeos; outra classe de proteínas apresenta uma serina-treonina quinase citoplasmática, mais que

também pode estar associada à membrana através da sua região N-terminal. E existe ainda a classe das proteínas R NB-LRR que são presumivelmente citoplasmáticas (embora também possam se associar à membrana) e apresentam um nucleotídeo de ligação (NB) que é essencial para ligação de ATP ou GTP, além de apresentarem diferentes domínios N-terminal (DANGL e JONES, 2001).

A existência de classes de proteínas R citoplasmáticas e transmembranas indicam que algumas são especializadas em detectar ligantes secretados e outras componentes da superfície do patógeno.

Muitos fungos patogênicos têm uma forma íntima de contato com a membrana da célula hospedeira, possuindo em sua superfície uma estrutura especializada para sua alimentação o haustório, que pode facilitar o transporte de efetores dentro do hospedeiro (DANGL e JONES, 2001).

Muitas proteínas R atualmente percebem a presença de mais de uma proteína de Avr mesmo que estas proteínas sejam de patógenos pouco similares ou com diferentes estilos de vida. Por exemplo, o gene *RPM1* reconhece dois genes de Avr não homólogos, em tomate o gene *Mi* confere não somente resistência a nematóides mais também a afídeos, alelos do gene *RPP8/HRT* reconhecem parasitas oomycetos e vírus. Além disso, um loco pode evoluir e gerar uma série alélica que pode conferir a capacidade de reconhecimento de múltiplos genes Avr (DANGL e JONES, 2001).

### **2.6.1 Resposta hipersensitiva**

Uma das respostas de resistência mais conhecidas é a resposta hipersensitiva (RH). Caracteriza-se pela morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro circundando os sítios de infecção. A reação é uma resposta induzida pelo patógeno, que culmina na parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta. No caso de fungos e bactérias presentes no local de expressão da RH, os mesmos são isolados pelos tecidos necróticos e morrem rapidamente. A resposta ocorre em função do reconhecimento da infecção, por parte do hospedeiro, como uma consequência da incompatibilidade entre a planta e o patógeno (LAM et. al., 2001).

A RH é altamente combinada (tanto temporal quanto espacialmente), com uma complexa resposta de defesa que envolve a produção de ácido salicílico,

indução na produção de etileno, fortalecimento da parede celular pela lignificação, produção de vários componentes antimicrobianos como as fitoalexinas, proteínas antifúngicas (LAM et. al., 2001).

Embora a resposta de defesa seja poderosa e possa parar infecções de vírus, nematóides, bactérias e fungos, suas limitações são que normalmente, ela é ativada somente com um reconhecimento altamente específico (por meios dos genes de resistência) de moléculas elicitoras (associadas ao patógeno). Essa percepção culmina no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e trocas entre  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , levando a uma acidificação da célula e a abertura dos canais de íons, particularmente do íon cloro, ativando do complexo NADPH - oxidase, que leva a produção de espécies reativas de oxigênio e a indução subsequente da transcrição de genes de defesa (DANGL et. al., 1996).

A identificação de reguladores de genes de defesa de plantas promove a evidência de que plantas usam diferentes rotas de defesa contra diferentes patógenos. Em geral essas rotas são caracterizadas pela sinalização molecular, que é uma etapa crucial na regulação da expressão de proteínas de defesa. A sinalização mais conhecida é a do ácido salicílico existindo também a do ácido jasmônico e a do etileno. O tratamento de plantas com ácido salicílico ou com análogos de ácido salicílico induz a expressão de um subconjunto de resposta de defesa de planta repelindo alguns patógenos, mais não todos. Uma proteína antifúngica identificada em plantas infectadas por patógenos pode ser induzida por qualquer um destes estímulos, só ou em combinação, indicando que o potencial de defesa foi estabelecido (LAM et. al., 2001).

### **2.6.2 Classificação epidemiológica da resistência**

No estudo do controle genético da resistência a *R. areola* no algodoeiro, a resistência pode ser classificada de acordo com sua efetividade contra raças de patógenos. Quando uma variedade é mais resistente a algumas raças de patógeno do que outras a resistência é chamada “vertical, perpendicular ou raça específica”, quando ela é uniforme contra todas as raças de patógeno ela é chamada “horizontal, lateral ou raças inespecíficas” (VAN DER PLANK, 1968).

Conseqüentemente, a determinação se a resistência será vertical ou horizontal se dá pelo tipo de mecanismo de defesa do hospedeiro e pelo processo

de ataque que o patógeno tem que empregar para superar isto (VAN DER PLANK, 1968).

Quando uma série de diferentes isolados de um patógeno é inoculada em uma série de diferentes cultivares de um hospedeiro pode-se ou não ter uma interação diferencial significativa. Na ausência de interação significativa, qualquer cultivar pode ser usado para obter um “ranking” dos isolados. Diz-se que a resistência do hospedeiro é do tipo horizontal e que os isolados diferem quanto à agressividade. Agressividade é representada pela existência de níveis diferentes de resistência entre as cultivares de acordo com a raça do patógeno, ou seja, uma cultivar sempre será classificada como resistente independente da raça do patógeno inoculada (MICHEREFF, 2007).

Na situação inversa, quando há interação diferencial o “ranking” dos isolados distinto para cada cultivar, a resistência é do tipo vertical e que o patógeno difere quanto à virulência (BERGAMIN FILHO, 1995). A presença de interação diferencial indica que há especialização do patógeno a nível interespecífico do hospedeiro e, neste caso os isolados são classificados em raças de acordo com seus espectros de virulência frente a uma série de hospedeiros diferenciais. Pode-se distinguir uma raça de acordo com as reações fenotípicas dos isolados quando inoculados em uma série de cultivares, denominada de série diferencial. Portanto raças possuem diferentes espectros de virulência (CAMARGO, 1995). Entende-se por virulência como a capacidade de causar doença em determinados genótipos.

### **2.6.3 Genética da resistência ao patógeno**

O marco inicial nos estudos genéticos das interações patógenos - hospedeiros ocorreram logo após a redescoberta da teoria de Mendel, na qual similaridades e diferenças entre plantas parentais e suas progênes podem ser explicadas pela passagem mecânica de unidades discretas de herança dos pais aos filhos, unidades essas chamadas genes (CAMARGO, 1995).

Características que podem ser separadas em duas classes fenotípicas descontínuas são chamadas qualitativas ou monogênicas, por exemplo, quando um único gene for suficiente para conferir resistência. Nem todos os caracteres herdados se expressam dessa maneira, a grande maioria das características de importância econômica como resistência a doenças, resulta da ação conjunta de

vários locos. Esses locos foram denominados poligenes por Mather (1941), sendo definido como genes que exercem efeito secundário sobre uma característica, também chamados de “genes menores”, e são observadas em uma população segregante que varia continuamente quanto à resistência, sem entrar em grupos claramente definidos. Por outro lado. O termo oligogenes designa poucos genes segregantes para a característica, o que não anula a presença de “um gene de efeito principal”, ou seja, um gene que exerce grande efeito sobre uma característica e vários genes atuando nesse caráter. Em muitos casos, a distinção entre poligenes e oligogenes não é muito fácil. Por esse motivo, Geldermann (1975) sugeriu o termo QTL (*Quantitative Trait Loci*) para designar estes locos controladores de características quantitativas (SHUSTER, 2004).

Mesmo sendo difícil a identificação de todos os genes envolvidos na característica na resistência poligênica, ela é considerada melhor porque (1): uma raça de patógeno pode suplantar só um gene de R, o que pode levar a uma epidemia mais lenta. É mais difícil acontecer quebra de resistência para um número maior de genes; (2): uma raça de patógeno que sofra uma mutação adicional para sobrepor a um segundo gene R poderá ser menos adaptável do que uma raça que se sobreponha a um único gene R, isto porque, para fugir do reconhecimento dos genes R, esta mutação seria de um gene *Avr*, que frequentemente são fatores de patogenicidade; (3): a inoculação de raças avirulentas pode promover uma resposta de resistência sistêmica adquirida, reduzindo a suscetibilidade das plantas a outros patógenos compatíveis com ela (DANGL e JONES, 2001).

Um dos maiores problemas associados à resistência poligênica reside na identificação de todos os genes responsáveis por esta característica. No caso da resistência monogênica, o problema não é tão grave assim, uma vez que os genes exercem uma grande influência sobre o fenótipo. No caso de poligenes, a contribuição fenotípica individual de cada gene não é tão evidente. A solução ideal seria “marcar” cada um dos poligenes, de modo que a seleção destes pudesse ser monitorada durante o programa de melhoramento (CAMARGO e BERGAMIN FILHO, 1995).

## 2.7 Marcadores moleculares

De acordo com Borém (2001), marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente distintos. Existem marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares. Dentre eles os marcadores moleculares ou de DNA são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética e mapeamento genético de resistência a pragas e doenças de diversas culturas por existirem em número praticamente ilimitado no genoma, além de apresentarem elevado índice de polimorfismo (BORÉM e CAIXETA, 2006).

No caso do algodão, numerosos marcadores moleculares foram desenvolvidos (CONNELL et. al., 1998; REDDY et. al., 2001; KUMPATLA et. al., 2002; NGUYEN et. al., 2004; ver também a “Cotton Microsatellite Database: <http://www.mainlab.clemson.edu/cmd/>) para serem usados na construção de mapas genéticos (REINISH et. al., 1994; SHAPPLEY et. al., 1998a; ZHANG et. al., 2002; LACAPE et al., 2003; RONG et. al., 2004).

Esses marcadores foram usados principalmente no mapeamento de caracteres de qualidade da fibra (SHAPPLEY et. al., 1998b; JIANG et. al., 1998; ULLOA e MEREDITH, 2000; KOHEL et. al., 2001; PATERSON et. al., 2003; ZHANG et. al., 2003; MEI et. al., 2004; LACAPE et. al., 2005), de características das plantas, como a pilosidade das folhas e do caule (LACAPE e NGUYEN, 2005), a morfologia das folhas (SONG et. al., 2005)

Alguns caracteres mais complexos, como o rendimento, ou componentes do rendimento, e a resposta da produtividade em função da água, assim como a relação desses caracteres complexos com o meio ambiente foram também estudados utilizando-se marcadores moleculares (PATERSON et. al., 2003; HE et. al., 2005; SHEN et. al., 2006).

Em comparação com os estudos sobre a qualidade das fibras, poucos trabalhos foram focados na identificação de marcadores moleculares ligados à resistência a doenças no caso do algodão. Atualmente, os únicos relatórios publicados neste sentido tratam sobre a identificação de marcadores moleculares associados à resistência à bacteriose (WRIGHT et al., 1998), murcha de *Verticillium* (BOLEK, et al. 2005) e do *Cotton Leaf Curl Virus* (RAHMAN et al., 2002). Foram

também identificados marcadores associados à resistência ao nematóide das galhas (BEZAWADA, et al., 2003; HINCHCLIFFE, et al., 2005).

## **2.7.1 Classes de marcadores moleculares**

### **2.7.1.1 RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)**

Os marcadores RAPD tem como base a técnica de PCR e utilizam um único par de oligonucleotídeo, normalmente com oito a dez nucleotídeos, e de seqüência arbitrária, para realizar a amplificação. Esta estratégia elimina a necessidade de conhecimento prévio dos fragmentos amplificados.

Os produtos da amplificação de fragmentos RAPD, são resultantes da amplificação distinta de regiões cromossômicas flanqueadas por um par de sítios de iniciação determinado pelo oligonucleotídeo sintético utilizado, *primer* (BORÉM e SANTOS, 2004). Entretanto este produto é gerado apenas se estas seqüências de DNA complementares ao *primer* estiverem distanciadas por no máximo 3000 pares de bases e em orientações opostas (LOPES et. al., 2004), permitindo a amplificação exponencial pela DNA polimerase.

Indivíduos geneticamente distintos produzem diferentes padrões de fragmentos amplificados. O polimorfismo molecular detectado é gerado por deleções em sítios de iniciação ou por inserção, que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer (LOPES et. al, 2004). Ferreira e Gratapaglia (1998) mostram que diferenças entre um único par de bases, mutação de ponto, causa a não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação e assim impede a amplificação de um segmento.

A principal característica desses marcadores é a dominância, ou seja, não é possível distinguir indivíduos homozigoto para a presença da banda do heterozigoto em uma população. Portanto, ausência da banda no gel é atribuída ao genótipo homozigoto para esse caráter, enquanto a presença da banda é denotada pelos genótipos homozigoto e heterozigoto. As grandes vantagens dessa técnica são: a simplicidade, a rapidez na obtenção de dados, o custo reduzido e a aplicação a qualquer tipo de organismo (BORÉM e CAIXETA, 2006).

### **2.7.1.2 SSR (Microsatélites)**

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas SSR (*Simple Sequence Repeats*), ou microsatélites. A estratégia para análise é a amplificação do fragmento que contém as repetições, utilizando-se, oligonucleotídeos que hibridizam com as regiões que flanqueiam as repetições. O fator limitante para o emprego da técnica de SSR é a disponibilidade de informação (em termos de seqüências) a respeito de regiões que possuam repetições no organismo que se deseja estudar (MATIOLI, 2001).

Estes marcadores estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade da técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Por ser um marcador codominante, ou seja, permite a visualização de ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto, possuem um elevado conteúdo de informação possibilitando a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, além de distinguir acessos de germoplasma diretamente relacionados (BORÉM e CAIXETA, 2006).

### **2.7.1.3 AFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado)**

Esta técnica também se baseia na amplificação via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro e de corte freqüente; posteriormente são ligados adaptadores nas extremidades coesivas deixadas pelo corte com as enzimas de restrição, a partir daí pode-se construir iniciadores específicos a essas seqüências para a pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Segue-se a última etapa, onde é feita a amplificação seletiva com *primers* construídos por uma seqüência complementar ao adaptador seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima, e uma extensão de nucleotídeos seletivos no terminal 3' (VOS, et. al., 1995).

Para separação e identificação dos produtos de amplificação por AFLP, o método mais adequado é a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona um alto nível de resolução, o número de fragmentos visualizados varia de algumas dezenas até uma centena. A leitura manual é realizada após a revelação do padrão de bandas com nitrato de prata segundo Creste et. al., (2001).

Esta técnica detecta um maior número de locos, comparativamente às demais técnicas de marcadores moleculares, e possibilita a ampla cobertura do genoma apresentando um baixo custo por informação (loco) (LOPES et. al., 2004).

## **2.8 Mapa genético do algodão**

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas. A identificação e mapeamento de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a *R. areola* no algodão, são importantes para incorporar a resistência em cultivares elites de algodão.

O mapeamento genético consiste na associação e ordenamento de marcadores em grupos de ligações nos cromossomos (TANKSLEY, 1993).

No contexto do melhoramento de plantas, os mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento.

A disponibilidade de mapas genômicos completos também abriu a oportunidade para detectar aproximações estatísticas de novos poligenes, portanto mapas de ligações moleculares, por estarem disponíveis no genoma inteiro são usados para estudos de características quantitativas de muitos organismos incluindo desde humanos (WISSENBACH et. al.,1992), a muitas espécies de plantas (VALLEJOS e TANSKSLEY, 1983), (COE et. al.,1990), (TANKSLEY, et. al.,1992).

No caso do algodão vários mapas genéticos foram construídos usando RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) (REINISH et. al., 1994; SHAPPLEY et. al., 1998; ULLOA e MEREDITH 2000), AFLP e SSR (NGUYEN et. al., 2004).

O CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa para o Desenvolvimento Agrônomico) construiu um mapa de ligação. O tamanho do genoma do algodão foi estimado em 3.700 a 5.519cM (Centimorgans), com uma população de retrocruzamento RC, a partir do cruzamento interespecífico entre Guazuncho 2 (*G. hirsutum*) e VH8-4602 (*G. barbadense*) e verificou que seriam necessários cerca de 270 marcadores moleculares com um espaçamento de aproximadamente 20cM para permitir uma cobertura completa do genoma (LACAPE, et. al., 2003; NGUYEN, et. al. 2004).

Essa mesma população foi utilizada para localizar QTL's de qualidade da fibra (LACAPE, et. al., 2005a) e QTL's de pilosidade da folha e do caule (LACAPE e NGUYEN, 2005).

Para realizar o mapeamento genético, são necessárias várias etapas:

- Seleção de variedades ou linhagens contrastantes para a característica de interesse;
- Cruzamento dos indivíduos contrastantes e obtenção de uma população segregante;
- Genotipagem (por marcadores) dos indivíduos da população segregante;
- Fenotipagem (para a característica) dos indivíduos da população segregante;
- Análise de co-segregação da característica com os marcadores;
- Cálculo da distância genética (frequência de recombinação) entre o marcador e o gene;
- Validação do marcador em outras populações.

Os genitores escolhidos para gerar a população de mapeamento devem ser contrastantes, pois segundo Barroso et. al. (2002), quanto maior a divergência entre os pais, maior deve ser a variabilidade das populações segregantes.

Uma das estratégias para facilitar o mapeamento molecular é o desenvolvimento de linhagens recombinates RIL's. Que são linhagens derivadas pelo método da descendência de única semente (SSD) do inglês, *Single Seed Descendent*, em que uma única semente de cada planta F<sub>2</sub> é plantada e a cada ciclo ela é autofecundada, até atingir alto nível de homozigose. A vantagem dessas

linhagens homozigotas é que elas podem ser reproduzidas e retestadas para uma medida mais precisa das características quantitativas (TANKSLEY, 1993).

O método de mapeamento por RIL's pode ser importante para o mapeamento de resistência à doença, pois a medição da intensidade de manifestação da doença pode ter imprecisão devido a fatores ambientais (principalmente temperatura e umidade) e dificuldade de uniformização do inóculo, dificultando o mapeamento. A utilização de RIL's pode minimizar esta dificuldade pela repetição dessa medição.

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência à *R. areola* no algodoeiro, permitirá a incorporação da resistência em cultivares elites de algodão.

### 3.0 OBJETIVOS

#### **Geral:**

Elucidar a estrutura genética e patogênica de isolados de *Ramularia areola* do Brasil e caracterizar a resposta de resistência do algodoeiro ao fungo.

#### **Específicos:**

- Analisar, através de marcadores moleculares a variabilidade genética de isolados de *R. areola*
- Estudar a patogenicidade de vários isolados de *R. areola*;
- Realizar um estudo de herança da resistência à mancha-de-ramulária;
- Colaborar com o mapeamento molecular dos genes de resistência a *R. areola* no algodoeiro.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Neste estudo foram utilizadas as linhagens de *G. hirsutum* DeltaOpal, suscetível, e a CNPA CO-11612, que foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da Embrapa – Algodão, resistente.

A população usada para análise molecular foi desenvolvida a partir do cruzamento interespecífico entre Guazuncho-2 (*G. hirsutum*) e VH8-4602 (*G. barbadense*) e consistiu de 140 RIL's, linhagens recombinantes, de F<sub>2:6</sub> a F<sub>2:9</sub>.

## 4.2 Obtenção dos isolados de *Ramularia areola*

Vinte oito isolados de *Ramularia areola* foram coletados de folhas de algodão infectadas. A região geográfica e a cultivar estão representadas no (Quadro 1).

**Quadro 1:** Identificação dos isolados de *Ramularia areola*

Isolado	Cultivar	Município
Ra 1.3	DeltaOpal	Goiânia - UFG
Ra 1.4	DeltaOpal	Goiânia - UFG
Ra 6.1	Iapar IPR-96	Moreira Sales -PR
Ra 7.1	-	Palmeiras de Goiás - GO
Ra 8.1	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 8.2	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 8.3	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 8.5	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 8.6	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 9.1	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 9.2	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 9.3	Delta Opal	Unaí - MG
Ra 10.1	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 10.2	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 11.1	Fibermax 966	Montividiu-GO
Ra 12.1	Sure Grow	Lucas do Rio Verde - MT
Ra 13.1	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 13.2	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 13.3	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 13.4	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 13.5	DeltaOpal	Unaí - MG
Ra 15.1	Acala 90	Santa Helena de Goiás - GO
Ra 16.1	DeltaOpal	Ipameri - GO
Ra Ipameri	DeltaOpal	Ipameri - GO
Ra PL CE 49	BRS Cedro	Primavera do Leste - MT
Ra PP2	BRS Cedro	Pedra Preta - MT
Ra PL Fábrica	Fabrika	Primavera do Leste - MT
Ra PP Serra da Petrovina	BRS Cedro	Pedra Preta - MT

#### **4.2.1 Isolamento de *R. areola***

De folhas de algodoeiro com a doença foram retirados micélios dos isolados de *Ramularia areola*, com a ajuda de um bastão de vidro. Esses micélios foram colocados em placas de Petri contendo meio V8 10% (RATHAIAH, 1976) e mantidos em incubadora (BOD) a 25° C. Em cada ponto onde propágulos do fungo ficaram aderidos ao meio, desenvolveram-se novas colônias.

#### **4.2.2 Esporulação de *R. areola***

Em placas de Petri contendo colônias com cerca de 30 dias, foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) para se obter uma suspensão de esporos, dessa suspensão foram retiradas alíquotas de 1mL para erlenmeyers contendo arroz autoclavados. Esses erlenmeyers foram mantidos a 25°C para crescimento desses isolados, 30 dias após o crescimento foram adicionados 100mL de água destilada esterilizada e dessa suspensão foram retirados alíquotas de 1mL e repassados para outros erlenmeyers contendo arroz para a manutenção dos isolados e inoculações posteriores.

#### **4.3 Plantio e Inoculação das Plantas**

Para inoculação dos ensaios foram adicionados 10mL de água destilada esterilizada nos erlenmeyers contendo arroz, em que haviam colônias de ramulária em desenvolvimento, dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 100µl para avaliação da concentração de esporos realizada com auxílio do hemacitômetro.

Suspensões calibradas para  $5 \times 10^5$  esporos/mL foram usadas para inocular, utilizando-se um pulverizador, algodoeiros com aproximadamente 25 dias de emergência (4 semanas), que haviam sido previamente mantidas em ambiente saturado (umidade relativa do ar acima de 80%) por 24 horas. As plantas inoculadas foram mantidas por uma semana em câmara de incubação com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade variando em torno de 90%. Após esse período, foram transferidas para casa de vegetação também com temperatura de 25°C e umidade relativa do ar variando entre 55 e 60%.

#### **4.3.1 Inoculação para estudo de herança de resistência a doença.**

Para realização do estudo de herança da resistência do algodoeiro a *R. areola*, foram realizados os plantios nos dias 27 de Julho, 11 de Agosto e 18 de Agosto de 2006, de sementes das gerações filiais F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, e dos parentais Guazuncho-2 e VH8-4602. Para inoculação deste experimento foi preparada uma suspensão com os isolados Ra 8.2, 8.3, 9.1, 13.1, 13.2 e 13.5, amostrados de áreas produtoras no Brasil, que haviam sido mantidos previamente em incubação entre 30 a 59 dias, e apresentaram uma maior esporulação no arroz. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos aumentados (Blocos de Federer) com dois tratamentos comuns (Guazuncho-2 e VH8-4602) e 135 tratamentos regulares plantas F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.

#### **4.3.2 Inoculação para o teste de variabilidade patogênica dos isolados de *R. areola***

Para avaliar a patogenicidade de seis diferentes isolados de *R. areola* foi realizado o plantio no dia 25 de Agosto de 2006 de plantas Guazuncho-2 e VH8-4602. A inoculação foi realizada no dia 22 de Setembro de 2006, usando os mesmos procedimentos descritos no ensaio anterior, porém com um único isolado do patógeno por cada bloco. Foi utilizado o delineamento de blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial (2 genótipos x 6 isolados).

#### **4.4 Avaliação dos Ensaio**

Quatro semanas após a inoculação de cada ensaio prosseguiram-se às avaliações com a identificação e contagem dos pontos necróticos das primeiras e segundas folhas verdadeiras de cada planta de algodão e contagem da esporulação para isto, foi feita a retirada de uma área de 0.5027 cm<sup>2</sup> das 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> folhas verdadeiras dos algodoeiros inoculados aos quais foi adicionado sulfato de cobre a 1M, prosseguindo-se a contagem dos esporos com auxílio do hemacitômetro.

#### 4.5 Extração de DNA do algodão

O DNA das cultivares ou linhagens de algodão (DeltaOpal, CNPA CO-11612, Guazuncho 2 e VH8-4602), foi extraído pelo método CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*), segundo protocolo de Ferreira e Gratapaglia (1998). Posteriormente, este DNA foi quantificado utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 0.8%, por comparação da intensidade de fluorescência de amostras com concentração conhecida do fago  $\lambda$  (*lambda*) coradas com brometo de etídio (EtBr) e visualizados em transluminador sob luz UV.

O DNA das RIL's foi extraído com MATAB (*Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide*) de acordo com o método de Risterucci et. al., (2000), seguindo-se ao mesmo procedimento de quantificação citado acima.

#### 4.6 Extração do DNA dos fungos

Colônias de uma placa de cada isolado foram retiradas e colocadas em tampão SDS (*Duodecil Sulfato de Sódio*) para extração do DNA, segundo o protocolo de Vidal et. al., (2005).

#### 4.7 Obtenção dos marcadores RAPD

As reações de amplificação do DNA da *Ramularia areola* para obtenção de marcadores RAPD, foram realizadas em tampão comercial 1X, contendo 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,3; e Triton X-100 0,1% adicionado a 15ng de DNA de cada isolado, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTP; 5 $\mu$ M de *primer* e 5 unidades de Taq DNA polimerase, para um volume final de 25 $\mu$ L.

Foram testados *primers* dos kits A, E e P sintetizados pela Operon Technologies, Alameda – USA, sendo dois do kit A (1 e 2), seis do kit E (14, 15, 16, 17, 18 e 19) e um do kit P (17).

A PCR foi realizada com uma denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos, cada qual com denaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento do *primer* a 35°C por 1 minuto e amplificação a 72°C por 2 minutos. Ao final desse ciclo, foi dado um período adicional de 5 minutos a 72°C para que as extensões se completassem.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose a 0,8% imerso em TBE (0,09M de Tris, 0,09M de Ácido Bórico e 2mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético). Estes géis foram corados com *cyber green* e visualizados em transluminador sob luz ultravioleta.

#### **4.7.1 Quantificação da variabilidade genética dos isolados**

Dados referentes aos marcadores moleculares RAPD, foram utilizados para cálculos de diversidade genética. As bandas foram interpretadas como dois alelos (presença e ausência) de um loco (PEEVER e MILAGROOM, 1994; McDONALD, 1997 citado por SUASSUNA, 2005). A diversidade genética da população de *R. areola* foi estimada pelo índice de diversidade de Nei- $H$  (NEI, 1987). A frequência de alelos de cada loco RAPD calculada para cada subpopulação foi usada para calcular a medida da diversidade gênica de (NEI, 1987), a qual indica a probabilidade de dois isolados, escolhidos aleatoriamente em uma subpopulação, possuírem alelos diferentes. A diversidade genética máxima é 1, enquanto a mínima 0 (zero), indica uma população geneticamente uniforme, formada por uma linhagem clonal. Também foi calculada a estatística  $G_{st}$  de Wrigth. As análises  $H$ ,  $G_{st}$  identidade genética de Nei e distância entre subpopulações foram realizadas com auxílio do programa PopGene versão 1.32 (Francis C. Yeh, University of Alberta, disponível em <http://www.ualberta.ca/fyeh/fyeh/>). Estimativas de fluxo gênico foram calculadas com base na estatística  $G_{st}$ . Calculou-se também o número médio de imigrantes ( $N_m$ ) que deve ser trocado entre as populações a cada geração para manter o nível de similaridade genética observada (McDEMOTT e McDONALD, 1993).

#### **4.8 Obtenção dos marcadores microssatélites (SSR)**

Os marcadores microssatélites utilizados foram de diferentes fontes, os BNLs foram desenvolvidos por Brookhaven Laboratório Nacional (E.U.A.), os JESPRs por Reddy et al., (2001) e Liu et al., (2000a e 2000b ), os NAUs por Han et al., (2004), e os CIRs pelo Nguyen et al., (2004). Foram selecionados 238 marcadores microssatélites, distribuídos no genoma a uma distância de 20cM, para mapeamento dos genes de resistência à mancha-de-ramulária, destes 35 marcadores foram selecionados para serem analisados pela Embrapa.

A reação PCR foi realizada a pH 8,3 em um volume total de 20uL, contendo tampão 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,3 e Triton X-100 0.1% adicionado a 25ng de DNA genômico, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTP, 0.2mM de *primer* e uma unidade de Taq DNA polimerase. Foram realizados 30 ciclos de temperatura, sendo cada ciclo composto por 93 °C por 1 minuto (passo 1), 50/51/55°C por 30 segundos (passo 2) e 72 °C por 1 minuto (passo 3), com uma extensão final de 72 °C por 8 min. As temperaturas de anelamento foram ajustadas para cada combinação de *primer*, de acordo com a recomendação de quem os desenvolveu.

Após as reações foram adicionados solução contendo 0,05% de azul de bromofenol, 90% de formamida e 500mM de EDTA Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% contendo 7M de uréia e corado com nitrato de prata (CRESTE et. al., 2001).

#### **4.9 Obtenção dos marcadores AFLP**

Os marcadores AFLP foram obtidos com o Kit AFLP *Analysis System I* da Invitrogen segundo o protocolo recomendado. Foram utilizadas 24 combinações de *primers*.

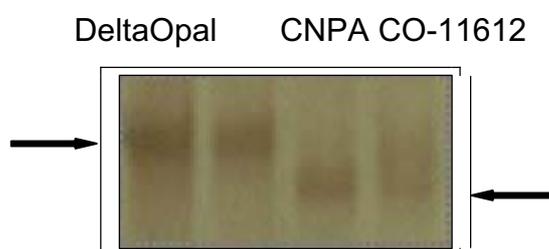
Tal como no SSR, foi adicionado às reações AFLP solução contendo 0,05% de azul de bromofenol, 90% de formamida e 500mM de EDTA. E os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% contendo 7M de uréia e corado com nitrato de prata (CRESTE et. al., 2001).

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO-11612

Nos programas de melhoramento da Embrapa – Algodão foi identificado uma linhagem de *G. hirsutum* CNPA CO-11612 que em condições de infestação natural foi resistente a *Ramularia areola*<sup>\*</sup>, esta linhagem, portanto foi escolhida para ser cruzada com a cultivar de *G. hirsutum* DeltaOpal, que é conhecida por ser muito sensível à doença.

Para estes pais eleitos, contrastantes para resistência, foi realizada a avaliação da taxa de polimorfismo molecular utilizando os marcadores moleculares SSR e AFLP. Foram analisados 118 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos pelo CIRAD, destes, 7 se mostraram polimórficos (Figura 4, ver quadro 2), correspondendo a 6% dos testados.



**Figura 4:** Polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO-11612 identificado com o marcador CIR 364.

**Quadro 2:** *Primers* que geraram bandas polimórficas entre DeltaOpal e CNPA CO-11612

Loco	Cromossomo	Tamanho aparente em (pb) pares de bases do alelo de DeltaOpal	Tamanho aparente em (pb) pares de bases do alelo de CNPA CO-11612
CIR 17	C1	128	131
CIR 63	C20	156	154
CIR 148	C12	147	150
CIR 249	C4	188	183
CIR 364	C5	155	153
CIR 373	C5	166	172
CIR 381	C14	247	252

\* Comunicação pessoal do Pesquisador da Embrapa - Algodão Nelson Dias Suassuna

Com o marcador molecular AFLP, foram avaliadas 24 combinações de *primers*. Foi verificado que o número de bandas polimórficas variou de 1 a 9, de acordo com a combinação de *primer* utilizada, como demonstrado no quadro 3. A combinação de *primers* EACA+MCAG foi a que gerou um maior número de locos polimórficos por uma única reação de PCR gerando uma taxa de polimorfismo de 14.76%. Foram identificadas um total de 21 bandas polimórficas, totalizando 308 locos, obtendo uma taxa de polimorfismo total de 5,3%.



**Figura 5:** Perfil de AFLP obtido com os *primers* EAAC+MCAA entre DeltaOpal e CNPA CO-11612. A seta indica a banda polimórfica presente em CNPA CO-11612 e ausente em DeltaOpal

**Quadro 3:** *Primers* AFLPs polimórficos, número total de locos e número de locos polimórficos entre as linhagens DeltaOpal e CNPA CO-11612.

<i>Primer</i>	Locos	Locos Polimórficos
EACA+MCAG	61	9
EAAC+MCAG	54	1
EAAG+MCAC	58	1
EAAC+MCAA	35	1
EACG+MCAC	27	4
EACG+MCAG	14	1
EACG+MCAT	27	3
EACG+MCTC	32	1

## 5.2 Diversidade genética dos isolados de *Ramularia areola*

Foram avaliadas três subpopulações de *R. areola* no Brasil a do Estado de Goiás com 13 isolados, Minas Gerais com 10 e Mato Grosso com 5, totalizando 28 isolados.

As análises com os marcadores moleculares RAPD permitiram a identificação de quarenta e quatro locos, desses 43 locos foram polimórficos, ou seja, estiveram ausentes em pelo menos um isolado. Foi utilizado o programa PopGene para estimar a diversidade genética total ( $H_t$ ), diversidade genética dentro das populações ( $H_s$ ) e entre as populações ( $G_{st}$ ) para cada loco (Tabela 1).

O valor estimado do ( $H_t$ ) igual a 0,307 foi baixo, a estimativa da diversidade genética dentro das subpopulações ( $H_s$ ) foi de 0,251, muito próximo ao valor  $H_t$  do A fração da variação genética distribuída entre as subpopulações –  $G_{st}$  (NEI, 1987) foi em média 0,18. Portanto 18% da variabilidade genética ocorreram entre as três subpopulações enquanto 82% desta variabilidade estão dentro dessas subpopulações. A diversidade genética dentro de subpopulações,  $H_s=0,251$ , foi similar à diversidade genética total,  $H_t=0,307$  e o  $N_m$  médio foi estimado em 2,20 indivíduos entre as três subpopulações.

**Tabela 1:** Frequência alélica de 44 locos RAPD em três subpopulações de *Ramularia areola*

Loco	Ht	Hs	Gst	Nm
1	0.4644	0.3267	0.2967	1.185
2	0.4888	0.3579	0.2677	1.367
3	0.2923	0.2548	0.1284	3.394
4	0.2923	0.2548	0.1284	3.394
5	0.1244	0.1067	0.1429	3.000
6	0.1244	0.1067	0.1429	3.000
7	0.4639	0.4624	0.0032	155.637
8	0.2655	0.2389	0.1002	4.491
9	0.3683	0.3535	0.0402	11.928
10	0.2053	0.1918	0.0661	7.065
11	0.1244	0.1067	0.1429	3.000
12	0.3683	0.3535	0.0402	11.928
13	0.3976	0.3645	0.0832	5.513
14	0.0000	0.0000	****	*****
15	0.1148	0.1109	0.0334	14.491
16	0.1148	0.1109	0.0334	14.491
17	0.1620	0.1526	0.0579	8.131
18	0.4990	0.4007	0.1969	2.038
19	0.4644	0.3267	0.2967	1.185
20	0.4701	0.3807	0.1901	2.129
21	0.0500	0.0473	0.0526	9.000
22	0.1110	0.1073	0.0329	14.681
23	0.4942	0.2723	0.4489	0.6138
24	0.2766	0.2709	0.0206	23.762
25	0.0644	0.0600	0.0690	6.750
26	0.2766	0.2709	0.0206	23.762
27	0.3311	0.2583	0.2200	1.773
28	0.3485	0.3413	0.0208	23.556
29	0.4511	0.2250	0.5012	0.4977
30	0.3805	0.2081	0.4530	0.6039
31	0.1549	0.1468	0.0525	9.031
32	0.4851	0.2946	0.3927	0.773
33	0.3927	0.3183	0.1895	2.138
34	0.2766	0.2709	0.0206	23.762
35	0.4247	0.4126	0.0285	17.037
36	0.3495	0.2740	0.2159	1.815
37	0.2361	0.1955	0.1720	2.406
38	0.3000	0.2504	0.1653	2.523
39	0.3641	0.3059	0.1597	2.630
40	0.4527	0.3323	0.2658	1.381
41	0.4380	0.3738	0.1465	2.912
42	0.4793	0.4738	0.0114	43.218
43	0.1049	0.0926	0.1176	3.750
44	0.4957	0.2773	0.4407	0.6346
Média	0.3078	0.2510	0.1847	2.206

$H_t$  = Diversidade genética total (NEI, 1987);

$H_s$  = Diversidade genética dentro de subpopulações (NEI, 1987);

$G_{st}$  = Diversidade genética entre as subpopulações, como uma proporção da diversidade total ( $G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$ ) (NEI, 1987);

$N_m$  = Fluxo gênico entre as subpopulações ( $N_m = 0.5 \times (1 - G_{st}) / G_{st}$ ) descrito por McDEMOTT e McDONALD, 1993)

Ao avaliar a correlação entre identidade genética e distância genética nas três subpopulações, foi observado que as subpopulações de Goiás e Minas Gerais são mais próximas e obtiveram maior índice de similaridade genética 0,927 comparado com Minas Gerais e Mato Grosso que obtiveram índice de similaridade genética de 0,879 (Tabela 2).

**Tabela 2:** Identidade genética de Nei (diagonal acima) e distância genética (diagonal abaixo) nas subpopulações de *R. areola*

	Goiás	Minas Gerais	Mato Grosso
Goiás	***	0.927	0.919
Minas Gerais	0.075	***	0.879
Mato Grosso	0.083	0.127	***

### 5.3 Estudo da agressividade de isolados de *R. areola*

Em estudos prévios Guazuncho-2 e VH8-4602 se mostraram contrastantes a mancha-de-ramulária em condições não controladas. Para repetir esses estudos sob condições controladas foi realizado um estudo da agressividade entre 6 isolados de *R. areola* que apresentaram melhor colonização nos meios de cultura. Em cada combinação isolado x cultivar foram avaliados os pontos necróticos e a esporulação.

Para a variável pontos necróticos (PN), a interação isolado x cultivar não foi significativa ( $p=0,93$ ) e houve diferença significativa entre os isolados ( $p=0,04$ ). As cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602, desenvolveram um maior número de pontos necróticos com o isolado Ra13.5 (Tabelas 3 e 4), porém como as variedades não diferiram estatisticamente entre si ( $p=0,35$ ), essa variável não pode ser utilizada para diferenciar as variedades Guazuncho-2 e VH8-4602 na resposta de resistência

**Tabela 3:** Número médio de pontos necróticos entre os isolados de *R. areola* observado em Guazuncho-2

Isolado	Guazuncho2
13.5 MG	171,3 a
8.2 GO	128,0 b
9.1 MG	118,5 b
13.3 MG	105,5 bc
8.3 GO	97,5 bc
13.2 MG	77,0 c

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**Tabela 4:** Número médio de pontos necróticos entre os isolados de *R. areola* observado em VH8-4602

Isolado	VH8-4602
13.5 MG	147,5 a
8.2 GO	117,0 ab
8.3 GO	116,5 ab
9.1 MG	101,0 bc
13.3 MG	86,0 bc
13.2 MG	29,3 c

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Para a variável esporulação houve diferença significativa na interação isolado x cultivar ( $p = 0,005$ ). Fixando-se o fator isolado para a variável esporulação foi observado que os isolados (Ra 9.1, 8.2 e 8.3) diferiram estatisticamente quando inoculados nas duas cultivares (Tabela 5).

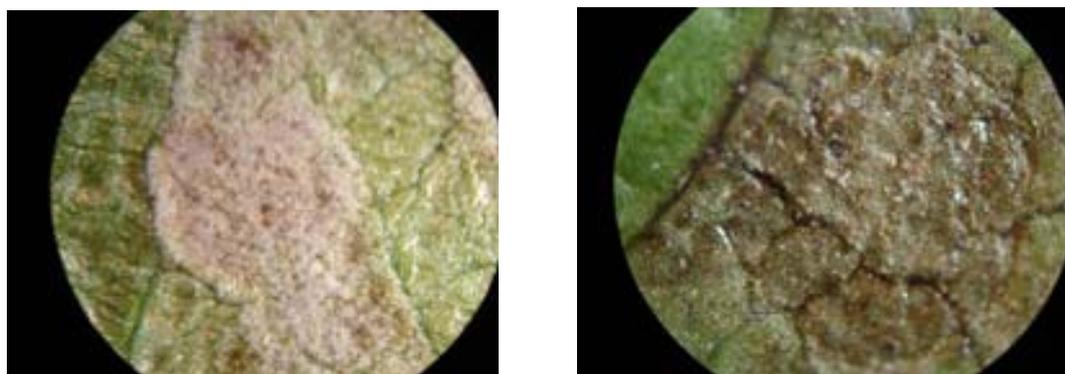
Não foi observada interação diferencial significativa entre isolados e cultivares, visto que nenhuma das médias de esporulação da cultivar VH8-4602 foram superiores às medias de esporulação da cultivar Guazuncho-2.

**Tabela 5:** Número médio de esporos entre os isolados de *R. areola* para as cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602

Isolado	Cultivar	
	VH8-4602	Guazuncho 2
9.1 MG	0,5 a B	87,67 a A
8.3 GO	0,13 a B	71,63 ab A
8.2 GO	0,5 a B	40,5 abc A
13.2 MG	5,88 a A	27,25 bc A
13.5 MG	2,25 a A	12,63 c A
13.3 MG	1,3 a A	9,38 c A

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Foi verificada diferença significativa entre os isolados somente dentro da cultivar Guazuncho-2 ( $p=0,001$ ), o isolado Ra 9.1 foi o mais agressivo obtendo a maior média de esporulação, e portanto foi selecionado para avaliação da reação de resposta de resistência contra a mancha-de-ramulária na população de RIL's. Foi verificada uma pequena esporulação na cultivar VH8-4602 (Figura 6), porém não foram observadas diferenças significativas entre os isolados dentro dessa cultivar ( $p=0,99$ ), indicando que ela obteve alto nível de resistência, porém não é totalmente imune a doença.



**Figura 6:** Esporulações observadas nas cultivares Guazuncho-2 (à esquerda) e VH8-4602 (à direita)

#### **5.4 Caracterização da herança do algodoeiro a *R. areola***

Foram realizadas avaliações do número de pontos necróticos e no número de esporos em plantas F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e nos parentais Guazuncho-2 e VH8-4602, em três experimentos, os valores obtidos estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Número de pontos necróticos avaliados na 1 e 2ª folhas verdadeiras de Algodão

Gen	Pontos necróticos	Esporulação	Gen	Pontos necróticos	Esporulação
Gua	346	38	70F2	494	6
VH8	732	0	71F2	114	0
2F1	40	163,5	72F2	325	0
3F1	35	218,5	73F2	76	14
1F2	17	16,5	74F2	254	0
2F2	17	1,5	75F2	216	2
3F2	125	0	76F2	271	0
4F2	91	41	77F2	201	1,5
5F2	0	1	78F2	142	0
7F2	65	38	79F2	54	0
8F2	50	0	80F2	0	0
9F2	21	0	81F2	121	0,5
10F2	14	101	82F2	108	0
11F2	73	0	83F2	184	2
12F2	203	101,5	95F2	104	2,5
13F2	6	1,5	96F2	83	241,5
14F2	7	18	97F2	84	165,5
15F2	14	66	98F2	12	41
16F2	27	1	99F2	32	0
17F2	3	0	100F2	43	7,5
19F2	9	0	101F2	49	38
20F2	19	2	102F2	56	40,5
21F2	42	0	103F2	41	9,5
22F2	60	3,5	104F2	263	195,5
23F2	63	0	105F	75	30,5
24F2	15	1,5	106F2	32	23,5
25F2	8	0	107F	51	25
26F2	74	135	108F2	297	46,5
27F2	22	1	109F2	24	51,5
28F2	2	36,5	110F2	173	54
29F2	223	19	111F2	121	162
30F2	45	55,5	112F2	0	0,5
31F2	174	15,5	113F2	69	1
32F2	30	14,5	114F2	59	127
33F2	0	0	115F2	105	93
34F2	6	0	116F2	8	1
35F2	25	6,5	117F2	103	144
36F2	4	0	118F2	18	5
38F2	63	25	119F2	113	74,5
39F2	47	116	122F2	7	0
40F2	103	312,5	123F2	28	14
41F2	0	0	124F2	174	65
42F2	0	1	125F2	45	33
43F2	18	79	126F2	23	10
44F2	0	0	127F2	268	50,5
45F2	16	15	128F2	32	67
46F2	115	266	129F2	396	180
47F2	1	7,5	130F2	165	0
48F2	2	0	131F2	41	42,5
49F2	4	1,5	132F2	290	41,5
50F2	0	52	133F2	12	15,5
51F2	12	2	134F2	95	90,5
52F2	21	5	135F2	156	36
53F2	107	150	136F2	137	33

54F2	82	2,5	137F2	234	372,5
55F2	41	3,5	138F2	35	69,5
56F2	206	0	139F2	154	123
57F2	39	28	140F2	224	85,5
58F2	175	17,5	142F2	226	148,5
59F2	14	8	143F2	112	0
60F2	230	17	144F2	85	103
61F2	179	10	145F2	20	28,5
62F2	204	0	146F2	33	75,5
63F2	180	10,5	147F2	107	277
64F2	0	0	148F2	88	128
65F2	134	15	149F2	4	2,5
66F2	57	56,5	150F2	8	1
67F2	329	6,5	*	*	*
68F2	169	3	*	*	*
69F2	302	49,5	*	*	*

Gen= Genótipo

As plantas F<sub>1</sub> foram avaliadas no primeiro ensaio e obtiveram 40 e 35 pontos necróticos respectivamente, no parental Guazuncho-2 não foram observados pontos necróticos no primeiro ensaio, obtendo no segundo e terceiro ensaio 329 e 52 pontos necróticos respectivamente. O parental VH8-4602 obteve 80, 593 e 178 pontos necróticos respectivamente obtendo média de 732 pontos necróticos nos três ensaios. Entretanto não houve diferença estatística significativa entre os parentais para a variável pontos necróticos, segundo o teste *F* ( $p=0,76$ ).

Para a variável esporulação foram verificadas diferenças estatísticas segundo o teste *F* ( $p=0,007$ ). Dados ajustados utilizando a análise de blocos aumentados estão apresentados na tabela 7.

**Tabela 7:** Valores médios dos tratamentos comuns (Guazuncho-2 e VH8-4602) e ajustados, para as plantas (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) referentes à variável esporulação.

Gen	Esp	Gen	Esp	Gen	Esp	Gen	Esp	Gen	Esp
Guaz	27	27F2	0	54F2	0	82F2	0	122F2	8
VH8	0	28F2	71	55F2	0	83F2	0	123F2	36
2F1	325	29F2	36	56F2	0	96F2	491	124F2	138
3F1	435	30F2	109	57F2	48	97F2	339	125F2	74
1F2	31	31F2	29	58F2	27	98F2	90	126F2	28
2F2	1	32F2	27	59F2	8	99F2	8	127F2	109
3F2	0	33F2	0	60F2	25	100F2	23	128F2	142
4F2	80	34F2	0	61F2	12	101F2	84	129F2	368
5F2	0	35F2	11	62F2	0	102F2	89	130F2	8
7F2	74	36F2	0	63F2	13	103F2	27	131D2	93
8F2	0	38F2	48	64F2	0	104F2	399	132D2	91
9F2	0	39F2	230	65F2	22	105F2	69	133D2	39
10F2	200	40F2	623	66F2	105	106F2	55	134F2	189
11F2	0	41F2	0	67F2	5	107F2	58	135F2	80
12F2	201	42F2	0	68F2	0	108F2	101	136F2	74
13F2	1	43F2	156	69F2	4	109F2	111	137F2	753
14F2	34	44F2	0	70F2	0	110F2	116	138F2	147
15F2	130	45F2	28	71F2	0	111F2	332	139F2	254
16F2	0	46F2	530	72F2	30	112F2	9	140F2	179
17F2	0	47F2	13	73F2	0	113F2	10	141F2	305
19F2	0	48F2	0	74F2	0	114F2	262	142F2	8
20F2	2	49F2	1	75F2	0	115F2	194	143F2	214
21F2	0	50F2	102	76F2	0	116F2	10	144F2	65
22F2	5	51F2	2	79F2	0	117F2	296	145F2	159
23F2	0	52F2	8	80F2	0	118F2	18	*	*
26F2	268	53F2	292	81F2	0	119F2	157	*	*

Média = 87,85

CV% = 13,085

P = 0,0073

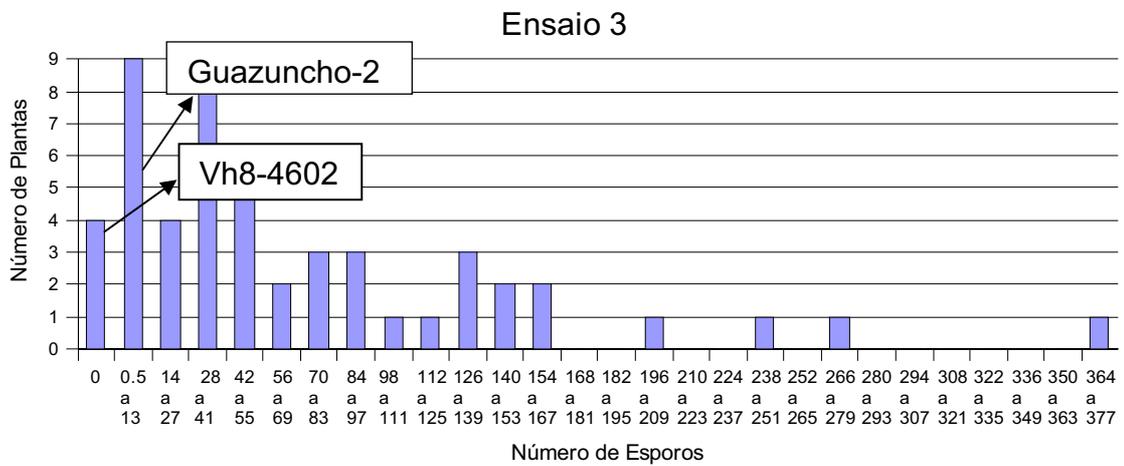
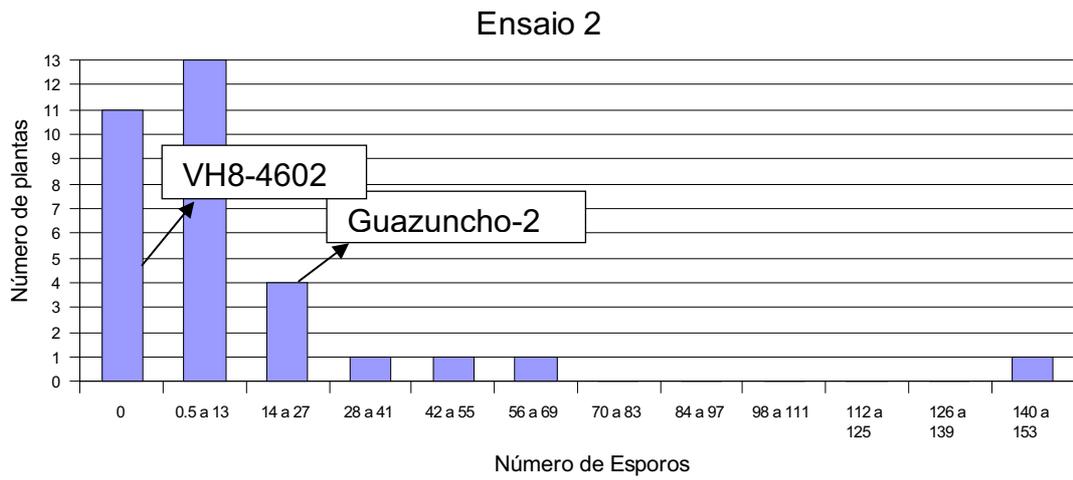
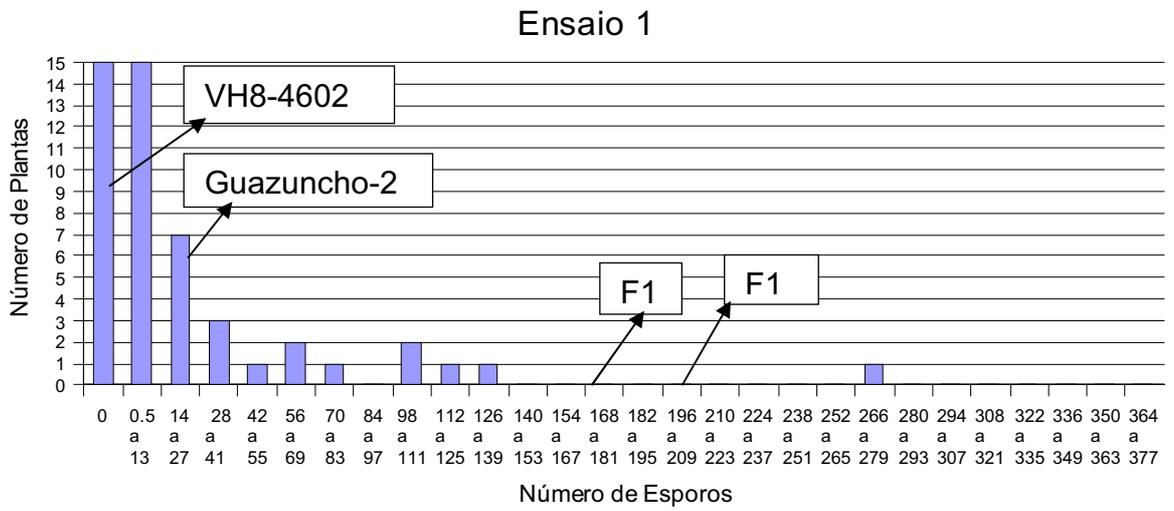
Gen = Genótipo

Esp = Esporulação

Foi identificado que os parentais diferiram entre si quanto à severidade da doença, Guazuncho-2 obteve média de esporulação de  $27 \times 10^4$  esporos/mL, e em VH8-4602 não foram observados esporos. As plantas F<sub>1</sub>, heterozigotas, obtiveram

325 e  $435 \times 10^4$  esporos/mL, respectivamente. Na geração  $F_2$  foi observada uma distribuição contínua do número de esporos, variando entre 0 a  $623 \times 10^4$  esporos/mL. A media de esporulação de alguns indivíduos  $F_2$  foi maior do que a obtida pelos parentais Guazuncho-2 e VH8-4602. O coeficiente de variação (13%) foi utilizado para agrupar os indivíduos da geração  $F_2$  em classes, a partir do número de esporos, obtido nos três ensaios. Gráfico 3.

**Gráfico 3:** Distribuição do número de plantas em função do número de esporos



Foi observado que as plantas F<sub>2</sub> (3, 8, 9, 11, 17, 23 e 34) desenvolveram pontos necróticos e não desenvolveram esporulação do fungo (Figura 6).



**Figura 7:** Exemplo de morte celular observada em plantas F<sub>2</sub>

As plantas 33F<sub>2</sub> e 41 F<sub>2</sub> não desenvolveram pontos necróticos, característica de morte celular, e não desenvolveram esporulação, aparentando resistência total, portanto não houve correlação entre o número de pontos necróticos e o número de esporos.

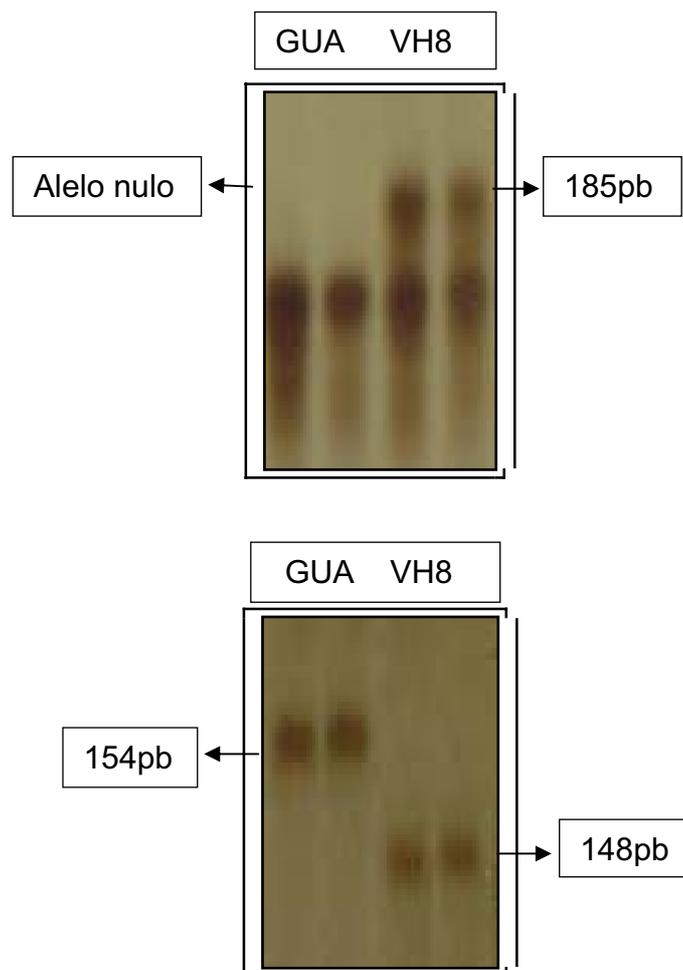
Existiram indivíduos como a 50F<sub>2</sub> e 142F<sub>2</sub>, que apresentaram esporulação e não desenvolveram pontos necróticos, portanto essas plantas aparentemente apresentaram compatibilidade com o fungo, permitindo sua penetração, colonização e esporulação (Figura 8).



**Figura 8:** Exemplo de esporulação de *R. areola* observada em plantas F<sub>2</sub>

## 5.5 Genotipagem das RIL's

Por já ter sido disponibilizada uma população de RIL'S para a Embrapa, provenientes do cruzamento interespecífico entre Guazuncho-2 (*G. hirsutum*) e VH8-4602 (*G. barbadense*) e por já existirem, desenvolvido pelo CIRAD para mapeamento de qualidade de fibra do algodoeiro, marcadores microssatélites polimórficos entre eles (Figura 9), foram realizados testes preliminares com a inoculação de um isolado de *R. areola* e avaliação das respostas de resistência à doença nesses genitores, verificando-se suscetibilidade em Guazuncho-2 e aparecimento de manchas necróticas que se assemelharam a manchas de hipersensibilidade em VH8-4602, portanto esses genitores foram selecionados para o mapeamento de genes de resistência a mancha-de-ramulária.



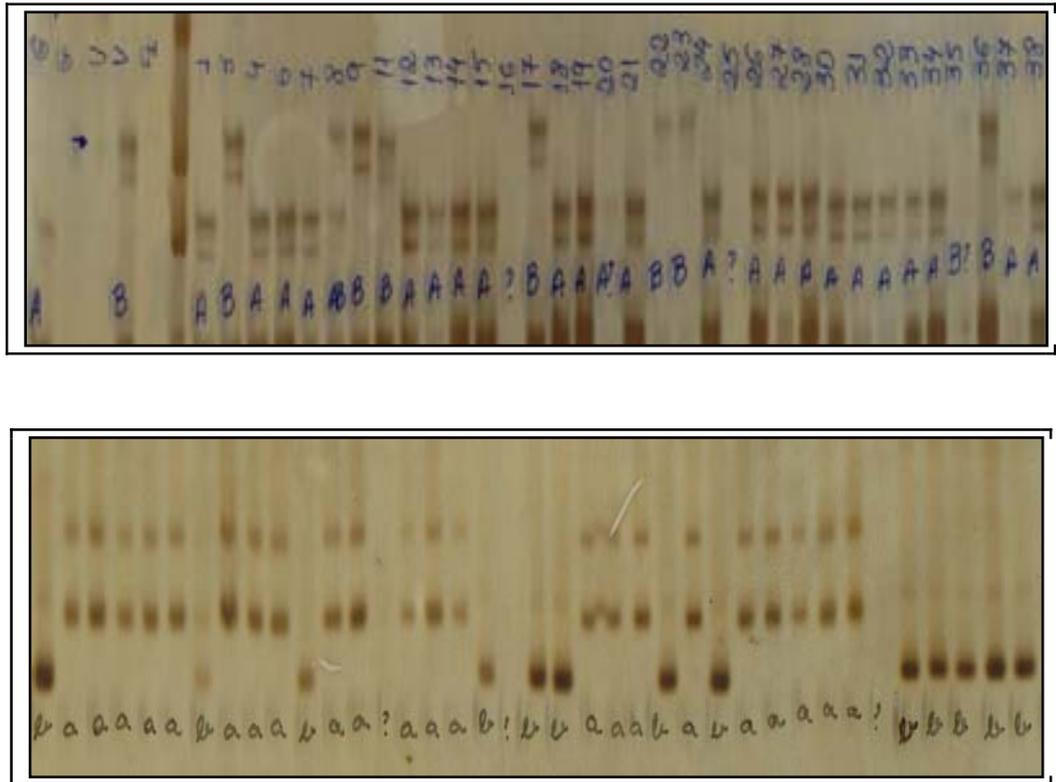
**Figura 9:** Polimorfismo entre Guazuncho-2 e VH8-4602 identificado com os marcadores SSR CIR 109 (superior) e NAU 864 (inferior)

Dos 238 marcadores moleculares conhecidos entre Guazuncho-2 e VH8-4602 selecionados para o mapeamento a mancha-de-ramulária, 35 foram selecionados para serem analisados pela Embrapa. Quadro 4.

**Quadro 4:** *Primers* selecionados na genotipagem das RIL's

<b>C15</b>	CIR 143	<b>C5</b>	NAU 922a	<b>C9</b>	NAU 966b	<b>C26</b>	CIR 085
<b>C15</b>	BNL 3902	<b>C5</b>	NAU 042a	<b>C9</b>	PAR 127b	<b>A01</b>	A 1345
<b>C2</b>	NAU 1246	<b>C5</b>	CIR 062a	<b>C9</b>	BNL 1672b	<b>A01</b>	NAU 1215
<b>C14</b>	BNL1059a	<b>D08</b>	NAU1042	<b>C9</b>	NAU 864	<b>A01</b>	BNL 1421
<b>C3</b>	BNL1059b	<b>D08</b>	CIR 062b	<b>C23</b>	CIR 200	<b>A03</b>	BNL3649b
<b>C17</b>	CIR 375	<b>C25</b>	CIR 109	<b>C23</b>	BNL 1317	<b>A03</b>	BNL2632a
<b>C22</b>	CIR 036	<b>C25</b>	BNL1047a	<b>C23</b>	BNL1672a	<b>A03</b>	CIR 399
<b>C22</b>	BNL1047b	<b>C25</b>	BNL 3103	<b>C23</b>	BNL1414a	<b>A03</b>	BNL 3442
<b>C22</b>	CIR 172	<b>C16</b>	NAU 966	<b>C10</b>	CIR 372	<b>A03</b>	NAU 922b
<b>C5</b>	NAU 1223	<b>C16</b>	BNL 3008	<b>C10</b>	CIR 104	<b>D02</b>	BNL3649a

A análise da segregação destes marcadores foi avaliada em 140 RIL's. Segregação dos alelos dentro da população pode ser observada na figura 10.



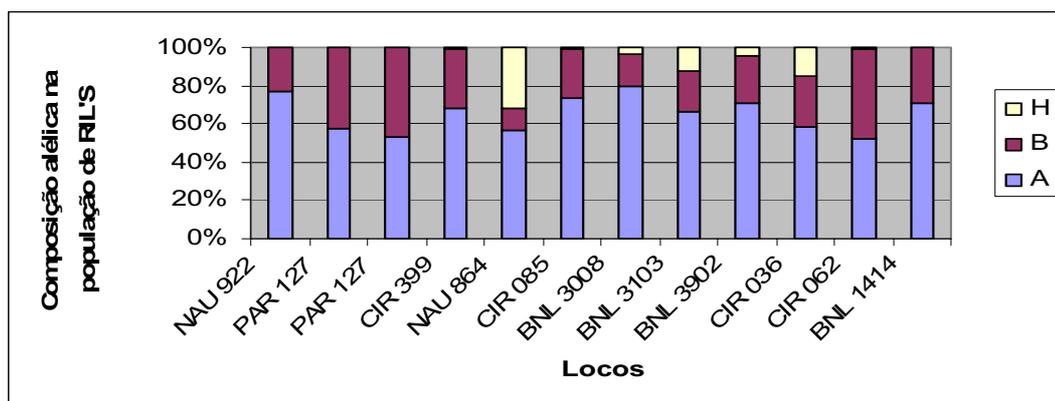
**Figura 10:** Perfil de bandas amplificadas em gel de poliacrilamida usando os marcadores co-dominantes BNL 3103 e BNL 1414 na população segregante RIL's.

Para todo indivíduo e todo loco, foram anotadas às composições alélicas A B ou AB. O teste do  $\chi^2$  ao nível de 5% de significância (Quadro 5), foi aplicado para verificar se a segregação dos alelos ocorreu de acordo com as leis de Mendel.

**Quadro 5:** Teste do Qui-Quadrado das freqüências genotípicas observadas.

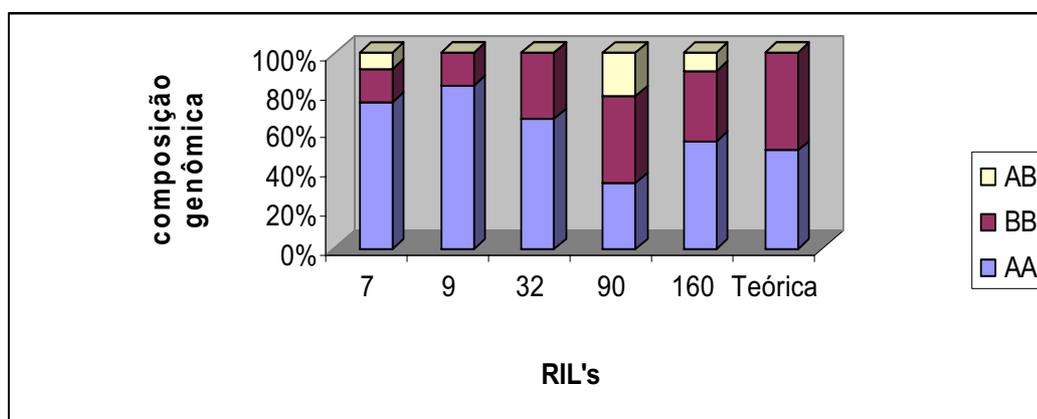
Cromossomos	Número de indivíduos AA	Número de indivíduos BB	Número de indivíduos AB	$\chi^2$
Primer NAU 922 Loco A 03	72	21	0	0,000
Primer PAR 127 Loco C 23	56	41	0	0,186
Primer PAR 127 Loco C 9	55	48	0	0,474
Primer CIR 399 Loco A 03	58	26	1	0,002
Primer NAU 864 Loco C9	52	11	29	0,000
Primer CIR 085 Loco C 26	57	20	1	0,000
Primer BNL 3008 Loco C16	85	18	4	0,000
Primer BNL 3103 Loco C 25	74	23	14	0,000
Primer BNL 3902 Loco C 15	73	25	5	0,000
Primer CIR 036 Loco C 22	52	24	13	0,000
Primer CIR 062 Loco C 05	46	41	1	0,866
Primer BNL 1414 Loco 23	88	37	0	0,000

A codificação utilizada para realização do teste do  $\chi^2$  foi A para o alelo de *G. hirsutum*, B para o de *G. barbadense* e H, para os heterozigotos. Foi verificado que embora a população avaliada esteja entre  $F_7$ - $F_9$ , em que eram esperadas freqüências de 99,2% para o alelo A (homozigoto para *G. hirsutum*) ou B (homozigoto para *G. barbadense*) e de aproximadamente 0,8% para AB (heterozigoto), foram observadas distorções nestas segregações utilizando alguns marcadores SSR (Gráfico 4).



**Gráfico 4:** Composição alélica observada por loco

Verificou-se uma maior predominância da composição do genoma de *G. hirsutum*, com relação ao de *G. barbadense*. Algumas linhagens como a RIL 9 apresentaram cerca de 80% de genótipo AA e 20% do genótipo BB, outras linhagens como a RIL 90 apresentou aproximadamente 35% do genótipo AB (heterozigoto) (Gráfico 5 e quadro 6).



**Gráfico 5** Composições genômica observada para algumas RIL's

**Quadro 6:** Freqüência do alelo A (*G. hirsutum*) e do alelo B (*G. barbadense*) de algumas RIL's

RIL's	Freqüência (%) do Alelo A	Freqüência (%) do alelo B
7	79,16	20,83
9	83,33	16,66
32	66,66	33,33
90	33,33	41,66
160	54,16	37,5

Outros locos apresentaram problemas nas reações de amplificação ou durante a eletroforese não permitindo sua análise. De maneira geral, *primers* que amplificam dois locos permitiram avaliação de apenas 1 (NAU 922 e BNL1414 ). Em alguns casos as bandas não se apresentaram definidas (A1345, CIR 143 e NAU 966) e às vezes ocorreu problema na reação PCR (BNL 3383, 3442, 3649 e CIR 375). A má definição de bandas pode ser causada por desuniformidade da aplicação de corrente elétrica durante a eletroforese, e o PCR pode ser prejudicado por má regulação das micropipetas ou qualidade da água ou reagentes. A identificação da freqüência da ocorrência destes problemas, e identificação das causas, deve auxiliar na tomada de decisão de possíveis soluções.

## 6.0 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de variedades com resistência genética à mancha de ramulária, vem enfrentando dificuldades devido, dentre outros fatores, a inexistência de conhecimentos sobre a diversidade do patógeno e de estudos sobre a agressividade dos isolados de *R. areola*, excepcionalmente no Brasil, como também a inexistência de estudos sobre o modelo de herança genética da resistência genética à mancha-de-ramulária no algodoeiro.

A disponibilidade de técnicas moleculares tem permitido estudar a biologia e a arquitetura genética das principais características de importância econômica, como resistência à doença. Dentre elas marcadores moleculares têm permitido a construção de mapas de ligação para várias espécies vegetais de interesse agrônomo. A primeira etapa para construção de um mapa genético é a seleção de uma população segregante que envolve a escolha inicial de genitores contrastantes para a característica de interesse. O melhorista geralmente recorre aos genes existentes em linhagens ou cultivares comerciais, pois estas são as fontes de mais fácil acesso. Elas oferecem a indiscutível vantagem de já serem melhoradas, isto é, a frequência de alelos que controlam características agrônomicas indesejáveis é muito baixa. Por isso buscou-se mapear genes de resistência à mancha-de-ramulária na própria espécie de *G. hirsutum*, visto que a transferência intraespecífica dos genes de resistência pode ser facilmente obtida através de cruzamentos. A linhagem CNPA CO-11612 identificada, dentro de *G. hirsutum*, como altamente resistente a *R. areola*, foi cruzada com DeltaOpal, variedade altamente suscetível. Entretanto, o polimorfismo genético entre CNPA CO-11612 e DeltaOpal foi baixo: dentre os marcadores analisados, 6% dos SSR e 5% dos AFLP foram polimórficos.

Este resultado já era esperado já que se trata de linhagens da mesma espécie, portanto o mapeamento molecular utilizando este cruzamento intraespecífico é de difícil execução. Wang et. al., (2006) também identificou um baixo polimorfismo entre as espécies de *G. hirsutum* Acala Nem X e Acala SJ-2, verificando que a população de mapeamento proveniente deste cruzamento

intraespecífico não era informativa o suficiente para realizar o mapeamento do gene de resistência *rkn1*.

Lacape et. al., (2003) indicaram que seriam necessários cerca de 270 marcadores moleculares polimórficos com um espaçamento de aproximadamente 20cM para realizar uma completa cobertura do genoma do algodão, como o índice de polimorfismo molecular identificado com os marcadores SSR avaliados foi de 6%, seriam necessários cerca de 1970 marcadores polimórficos para realizar este mapeamento, quantidade atualmente inviável para este projeto.

A análise da estrutura genética das subpopulações de *R. areola* revelou uma variabilidade genética intra populacional de ( $H_s$ ) de 0,2510, representando cerca de 81% da variabilidade genética total da população estudada ( $H_t$ ) de 0,3078, portanto a diferença genética entre as subpopulações é de cerca de 11%, ou seja, a probabilidade de dois isolados diferentes escolhidos aleatoriamente nas subpopulações, possuírem alelos diferentes é de cerca de 11 a cada 100. Resultado semelhante obteve Maruku e Hsiang (1999) analisando estrutura genética de populações de *Sclerotinia homoeocarpa*, obtendo diversidade genotípica total ( $H_t$ ) de 50,7%, sendo 49,3% dessa diversidade verificada dentro das populações. Uma possível explicação para essa alta diversidade genética intrapopulacional em Ramulária seria a ocorrência de mutações favoráveis ao patógeno nessas subpopulações que foram mantidas devido a um relativo isolamento geográfico ou devido aos mecanismos de recombinação.

O valor do  $G_{st}=0,18$  obtido sugere que as subpopulações de *R. areola* avaliadas são geneticamente muito semelhantes, havendo pouca diferenciação entre elas, o nível de fluxo gênico foi relativamente alto ( $N_m=2,20$ ), visto que  $N_m$  maior ou igual a 1 é suficiente para impedir a divergência entre as populações. Wang et. al., (2006) avaliando a estrutura das populações de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* na Austrália obteve resultados similares identificando uma baixa diferenciação  $G_{st}=0,1825$ , e um nível de fluxo gênico relativamente alto ( $N_m=2,23$ ). Essa similaridade pode ter acontecido devido a forma de dispersão da *R. areola*, que podem ser por via aérea, pelo solo ou pela água, o que facilita o estabelecimento do patógeno em áreas distantes. Essa alta taxa de migração é preocupante uma vez que facilita a dispersão de linhagens virulentas do patógeno que venham a surgir por meio de mutações e recombinações.

Na avaliação da agressividade dos isolados de *R. areola*, o número de esporos por área foliar pareceu ser uma boa medida para comparação dos níveis de resistência das cultivares e do nível de agressividade dos isolados, ao contrário do número de pontos necróticos visto que esta variável não apresentou diferença estatística ( $p=0,93$ ) no período analisado, resultado distinto poderá ser obtido analisando-se em períodos distintos essa variável.

Na avaliação da esporulação foi identificado que as cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602 diferiram entre si quando inoculadas com os isolados 9.1, 8.2 e 8.3, porém diferenças significativas entre os isolados foram observadas apenas quando dentro da cultivar suscetível Guazuncho-2 ( $p=0,001$ ), em que o isolado Ra 9.1 apresentou a maior média de esporulação nessa cultivar. Não foi identificada interação diferencial do patógeno com as cultivares, portanto o isolado 9.1 foi classificado como o mais agressivo e a resistência classificada por horizontal. Resultado semelhante foi observado por Rathaiah (1976), que identificou diferentes tipos de agressividade dentre os isolados de *Ramularia areola*, sendo os de Madagascar mais agressivos que os da Costa do Marfim e da Índia, que apresentaram agressividade moderada e baixa respectivamente.

Durante as avaliações de herança da resistência à mancha-de-ramulária, foram observadas nas plantas  $F_1$  e  $F_2$  valores de esporulação superiores aos valores do parental Guazuncho-2 (suscetível), o que provavelmente pode indicar que o parental VH8-4602 também apresenta locos com alelos que conferem suscetibilidade que puderam ser observados na população segregante. Sendo os heterozigotos mais suscetíveis que os homozigotos para os locos que segregam no cruzamento, a resistência provavelmente é recessiva. Outra doença de algodoeiro para a qual Bezawada et. al., (2003) identificaram um gene recessivo que confere resistência é o nematóide de galhas, causado por *Meloidogyne incognita*. McPherson et. al., (2004) identificaram dois genes, um dominante e um gene com efeito aditivo, em linhagens M315 de *G. hirsutum* para resistência a nematóide.

A presença de uma variação contínua de graus de resistência a mancha de ramulária para as características pontos necróticos e esporulação na geração  $F_2$ , caracteriza variação transgressiva e herança poligênica, que deu-se possivelmente pela combinação de genes de resistência das cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602. Esse tipo de resistência é considerada melhor por sua maior durabilidade, porém a

identificação dos locos envolvidos pode ser difícil, em razão da baixa expressão fenotípica dos genes envolvidos.

Assim, o mecanismo de resistência identificado apresenta uma variação fenotípica contínua para a característica esporulação indicando que provavelmente se trata de uma herança poligênica e a resistência é do tipo horizontal. Tanto a variabilidade relativamente baixa, como a resistência poligênica, indica tendência de alta durabilidade da resistência.

É comum encontrar na literatura que a resistência vertical é do tipo monogênica, ou seja, um gene de agressividade do patógeno corresponde a um gene de resistência do hospedeiro, enquanto que a resistência horizontal é do tipo oligo/poligênica. A resistência vertical, geralmente manifesta-se conferindo a cultivar que a possui imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno (efeito qualitativo). A resistência horizontal, apesar de efetiva contra todas as raças, geralmente não confere imunidade, mas níveis de resistência, e suas formas de atuação, podem diminuir o tamanho das lesões produzidas pelo patógeno, aumentar seu período de incubação, diminuir o número de esporos produzidos por lesões, e assim por diante. Todos os seus efeitos são parciais e quantitativos: em cultivares com resistência horizontal, a eficiência de infecção é menor do que em uma cultivar suscetível, as lesões crescem mais lentamente, os esporos são produzidos mais tardiamente e em menor quantidade, etc. Todos estes efeitos somados produzem uma redução na taxa de desenvolvimento da doença, sem afetar significativamente o inóculo inicial (MICHEREFF, 2007).

A avaliação do mecanismo de resistência das cultivares testadas se tomarmos a definição de resposta hipersensitiva como existência de morte celular gerada pela incompatibilidade entre planta e patógeno, a resistência das cultivares testadas de *G. barbadense*, inclusive VH8-4602, não é uma resposta hipersensitiva clássica visto que houve esporulação do patógeno. Este conceito de resistência, antes da fitopatologia que da bioquímica, é importante, pois na eventualidade da incorporação deste tipo de resistência em variedades comerciais, existiriam implicações, uma epidemiológica, já que o patógeno esporulou, e portanto, pode propagar a partir destas variedades. E também de resistência: uma vez que a doença se expressa, embora em nível significativamente menor, pode haver nível significativo de perda de produção devido à perda de área foliar, o que não foi medido neste trabalho.

Contrariamente, do ponto de vista bioquímico, a resposta hipersensitiva caracteriza-se por existência de genes, normalmente genes R, que, a partir do reconhecimento de um elicitador do patógeno, desencadeiam mecanismos de transdução de sinal que culminam com a morte das células do hospedeiro (DANGL e JONES, 2001). Os mesmos mecanismos bioquímicos característicos da resposta hipersensitiva poderiam estar presentes na reação de algumas variedades de *G. barbadense* a *R. areola*, uma vez que alguns indivíduos da geração F<sub>2</sub> apresentaram lesões necróticas característica de morte celular, e impediram o desenvolvimento do patógeno, visto que não apresentaram esporulação. Entretanto, a resposta hipersensitiva é uma resposta rápida, e as lesões necróticas demoraram a aparecer no caso de *R. areola*, tendo as primeiras lesões surgido entre 13 a 22 dias após as inoculações.

Segundo Rathaiah (1976) as cultivares Tadra-16 e Pima-67 de *G. barbadense* e BJA-592 e Reba BTK-12 de *G. hirsutum*, quando inoculadas com quatro isolados de *Ramularia areola*, apresentaram reação de hipersensibilidade. Entretanto, ao realizar a inoculação com o isolado Ra 9.1 nessas variedades (dados não mostrados) foi identificado que todas elas apresentaram esporulação, e em Tadra-16 não foram observados pontos necróticos.

Na análise da população de mapeamento Tanksley et. al., (1992) sugerem para obter maior número de locos informativos a realização de cruzamentos interespecíficos. Por isso foi avaliada a população de RIL's derivadas do cruzamento interespecífico de *G. hirsutum* (variedade Guazuncho-2, suscetível) e *G. barbadense* (VH8-4602, resistente), acordou-se proceder ao mapeamento molecular da população de RIL's em trabalho conjunto, sendo a fenotipagem realizada na Embrapa e a genotipagem realizada em conjunto pela Embrapa e pelo CIRAD.

A análise de alguns locos selecionados para a Embrapa e analisados na população de RIL's demonstrou que 25% dos marcadores segregam de acordo com as leis de Mendel. No entanto, em 75% dos marcadores analisados pode-se observar uma distorção de segregação com um alto percentual de heterozigotos e uma predominância dos alelos de *G. hirsutum*.

Existe uma pequena probabilidade associada ao aparecimento de heterozigotos, no entanto muito baixa numa população de RIL's, que esteja acima da geração F<sub>6</sub>. Nestes genótipos provavelmente as combinações gênicas dos

heterozigotos e dos alelos de *G. hirsutum* determinaram uma maior viabilidade nesses genótipos e por isso essas frequências foram mantidas.

Este fenômeno de distorção também foi observado em algodão por Thomas (2006) realizando a genotipagem das RIL's com os *primers* selecionados para o CIRAD. Frelichowski Jr et. al., (2006) verificaram distorção em 70 marcadores dos 131 selecionados para mapeamento de Acala Maxxa. Numa população de 287 RIL's de arroz foi observado uma distorção de segregação com a predominância de 80% dos alelos paternos (WANG et. al., 1994), predominância esta que aumentou a cada geração de autofecundação das RIL's através de um efeito de interação genoma/ambiente acumulando alelos favoráveis de um dos pais (PARAN et. al., 1995; XU et. al., 1997).

Com todos esses resultados foi possível identificar que as três subpopulações analisadas apresentam grande similaridade entre si, e os isolados das regiões de Goiás e Minas Gerais apresentaram maior similaridade genética entre si, do que cada um deles com o Mato Grosso. No entanto pela análise da agressividade foi verificado valores contrastantes para esse caráter nos isolados de Minas Gerais. Isso é corroborado pelos dados da diversidade genética dentro das populações, em que foi verificado que mais de 80% da variabilidade genética total existente está dentro das populações. Portanto estudos posteriores devem ser realizados para verificar a agressividade de isolados de outras regiões do Brasil, para nas análises de resposta de resistência de algodoeiros em campo sejam utilizados os isolados mais agressivos, visto que a evolução selecionará esses indivíduos, e estes provavelmente serão predominantes nos campos, já que foram observados altos níveis de migrações entre as subpopulações avaliadas.

Em adição o modelo de herança obtido indicou provavelmente herança poligênica e resistência horizontal, ou seja, a resistência nas cultivares é mais durável e cultivares apresentarão resistência média a todos os isolados, portanto genótipos que apresentarem algum grau de resistência ao patógeno em uma dada região também vão expressar tal fenótipo em outra região.

## 7.0 CONCLUSÕES

- Polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO-11612 é baixo.
- A diversidade entre as subpopulações de *R. areola* é relativamente alta.
- Não existe interação diferencial entre raças do patógeno e níveis de resistência nas cultivares Guazuncho-2 e VH8-4602 (a resistência é horizontal).
- A herança é recessiva e poligênica.
- Pode-se utilizar o cruzamento interespecífico entre Guazuncho- 2 e VH8-4602 para mapeamento dos genes de resistência a mancha-de-ramulária.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovitch, R. B. e Martin, G. B.** (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 356-364
- Alfonso, C. R.; Raposo, R. E.; Melgarejo, P.** (2000) Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouse in south-eastern Spain. *Plant Pathology*. V. 49. p. 243-251
- Barroso, P. A.V.; Borém, A.; Freire, E. C.; Ponna, J.C.V.** (2002) Fluxo gênico: Análise do caso de algodão no Brasil. *Rev. Biotec. Ciência & Desenvolvimento*, n. 29, p. 104-113.
- Beasley, J. O.** (1942) The production of polyploids in *Gossypium*. *J. of Heredity*, v.31, p. 39-48
- Beltrão, N. E. de M.** (1999). *O Agronegócio de algodão no Brasil*. Volume I. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília pp.17-85
- Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L.** (1995) Manual de fitopatologia. Ed. *Agronômica Ceres Ltda*. São Paulo.
- Bezawada, C. Saha, S. Jenkins, J. N. Creech, R. G. McCarty, J. C.** (2003) SSR marker(s) associated with root-knot nematode resistance gene(s) in cotton, *J. Cotton Sci.* 7:179-184
- Bezerra, C. de S.** (2007) Estrutura genética e sensibilidade a fungidas de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo cinzento da mamoneira. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Nata I- RN.
- Bolek, Y.; Kamal, M. El-Zik; Pepper, A. E.; Bell, A. A.; Magill, C. W.; Thaxton, P. M.; Reddy, O. U. K.** (2005) Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. *J. Plant Sci.* 168: 1581-1590
- Borém, A.** (2001) *Melhoramento de plantas*. 3° ed. Viçosa: Editora UFV, 500p.
- Borém, A. e Caixeta, E.T.** (2006) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG. 374p
- Borém, A. e Santos, F. R.** (2004) *Biotecnologia Simplificada*. 2° ed. Viçosa: Editora UFV, 302p.
- Brubaker, C. L. e Wendel, J. F.** (2001) RFLP diversity in cotton, In Cotton, emerging technologies. *Science Publisher, Inc*, Enfield, NH p.81-101

- Camargo, L. E. A.** (1995) Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: *Manual de Fitopatologia*. Ed. Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. pp. 470-491.
- Camargo, L. E. A. e Bergamin Filho, A.** (1995) Controle Genético. In *Manual de Fitopatologia*. Ed. Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. pp. 729-760.
- Carakbarty, P. K.; Mukewar, P. M.; Raj, S.; e Kumar, V. S.** (2002) Biochemical factors governing resistance in diploid cotton against grey mildew . *Indian Phytopath.* v. 55. (2) 140-146
- Cauquil, J. e Sément, G. L** ( 1973)e faux mildiou du cotonnier (*Ramularia areola* Atk.) dans le sud-ouest de Madagascar. *Coton et Fibres Tropicales*, v.28, p.279-286, 1973.
- Coe, E. H.; Hoisington, D. S.; Neuffer, M.G.** (1990) Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2N=20). In *Genetic Maps*, ed. SJ O' Brien, New York: Cold Spring Harbor Lb. Press. p. 6.39-6.67
- Companhia Nacional de Abastecimento:** Conab Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conab/web> > Acesso Janeiro 2007
- Connell J.P., Pammi S., Iqbal M.J., Huizinga T., and Reddy A.S.** (1998). A high through-put procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16: 341-349
- Cooke, D. E. L. e Lees, A. K.** (2004) Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Phytopathology*. v. 61 p. 42-44
- Creste, S.;Tulmann, A.; Figueira, A.** (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Reporter*, v.19, p. 299-306.
- Dake, G. N. e Kannan, A.** (1982) Reaction of cotton species and varieties to *Ramularia areola*. *Indian Phytopathology*, v.35, n.1, p.156-158. Dept of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Dangl, J. L. e Jones, J. D. G.;** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. v 411, pp 826-833
- Dangl,J. L.; Dietrich, R. A. e Richberg, M. H.** (1996) Death Don't have No Mercy: Cell Death Programs in Plan-Microbe Interactions. *The Plant Cell*. v.8, 1793-1807.
- Ehrlich, J. e Wolf, f. A.** (1932) Areolate Mildew of Cotton. *Phytopathology*. v. 22, pp. 229-240

- Feng, C. D.; Stewart, J. McD.; Zhang, J. F.** (2005). STS markers linked to the RF1 fertility restorer gene of cotton. *Theor Appl Genet* 110: 237-243
- Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D.** (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p
- Freire, E.C.** (1998). *Algodão no Cerrado*. Embrapa – CNPA. Documentos, 57 Campina Grande – PB. 29p
- Frelichowski Jr J. E.; Michael, B.; Palmer, D. M.; Jeffrey, P.; Tomkins, R. Cantrell, G.; David, M.; S. John, Y.; Russell, J.; K.; Mauricio, U.** (2006) Cotton genome mapping with new microsatellites from Acala 'Maxxa' BAC-ends *Mol Gen Genomics* 275: 479 –491
- Fryxell, P. A.** (1992) A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea* 2:108 –165
- Geldermann, H.** (1975) Investigation in inheritance of quantitative Brazil characters in animals by gene markers. I Methods. *Theor. Appl. Genet.* v.46:319-330
- Han, Z.; Guo, W. Z.; Song, X. L.; Zhang, T. Z.** (2004) Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton, *Mol. Genet. Genom.*
- Harland, D. C.** (1940) New allopolyploids in cotton by use of colchicines. *Trop. Agric.* V.17, p. 53-55
- He D-H, Zhong-Xu Lin, Zhang X-L, Nie Y-C, Guo X-P, Feng C-D, Stewart JMcD.** (2005). Mapping QTLs of traits contributing to yield and analysis of genetic effects in tetraploid cotton. *Euphytica* 144: 141-149
- Hinchliffe, D. J.; Yingzhi, L.; Potenza, C.; Gopalan, C. S.; Cantrell, R. G.; Zhang, J.** (2005) Resistance gene analogue markers are mapped to homologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* 110:1074-1085
- Holey, N. R.; Sapute, G. N.; Ghoderao, B. N.; Peshney, N. L.** (1992) Evaluation of diploid cottons (*Gossypium* species) for resistance to grey mildew disease caused by *Ramularia gossypii* *Crop Protection* 62:293-294
- Jiang, C.; Wright, R.J.; EL-Zik, K.M. e Paterson, A.H.** (1998) Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 4419-4424
- Kohel, R. J.; Yu, J.; Park, Y.-H.; e Lazo, G.** (2001). Molecular mapping and characterization of traits controlling fiber quality in cotton. *Euphytica*, 121: 163-172

- Kumpatla, S.P., Horne, E.C., Shah, M.R., Gupta, M., e Thompson, S. A.** (2002). Development of SSR markers: towards genetic mapping in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Cotton Science*, 14 (suppl.): 28
- Lacape, J. M. e Nguyen,T.B.**(2005). Mapping quantitative trait loci associated with leaf and stem pubescence in cotton. *Journal of Heredity* 96(4): 441-444
- Lacape, J. M.; Nguyen, T. B.; Courtois, B.; Belot, J. L.; Giband, M.; Gourlot, J. P.; Gawryziak, G.; Rouques, S; Hau, B.** (2005a). QTL analysis of cotton fiber quality using multiple *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross generations. *Crop Science* 45: 123-140
- Lacape, J. M.; Nguyen, T. B.; Thibiviliers, S.; Bojinov, B.; Courtois, B., Cantrell, R. G.; Burr, B.; Hau, B.** (2003). A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46(4): 612-26
- Lam, E.; Kato, N.; e Lawton, M.;** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response .*Nature*. v 411, pp 848-853.
- Liu L, Guo W, Zhu X, Zhang T.** (2003). Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. *Theor. Appl. Genet.* 106: 461-469
- Liu, S. Cantrell, R. G.; Maccarty, J. C.; Stewart, J. M.** (2000a). Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock acessions. *Crop Science*, v.40, pp.1459-1469
- Liu, S.; Saha, S.; Burr, B.; Cantrell, R. G.** (2000b) Chromosomal assignment of microsatelite loci in cotton. *Journal of Heredity*, v.91, n.4, pp.326-332
- Lopes, R.; Gomes L. M. T.; Figueira, A. V. de O.; Camargo, L. E. A.; Fungaro, M. H. P.; Carneiro, M. S.; Vieira, M. L. C.** (2004) Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). Aspectos técnicos e Interpretação genética. *Biotec. Ciência & Desenv.* Nº. 29
- Mahuku, G. S. e Hsiang, T.** (1999) Genetic variation within and between southern Ontario populations of *Sclerotinia homoeocarpa* *Plant Pathology* 48, 83–94
- Maranha, F. G. C. B.; Ramalho, M. A. P.; Farias, F. J. C.** (2002) Estratégias de análises da reação de cultivares de Algodoeiro a patógenos. *Rev. Bras. Ol. e fibros.* Campina Grande. v.6., n. 2: 565-575
- Mather, K.** (1941) Variation and selection of polygenetic characters. *J. Genetics.*, v.41, p. 159-193.

- Matioli, S. R.** (2001) *Biologia molecular e evolução*. Ed. Horos. Ribeirão Preto. 202p.
- Mc Demott e Mc Donald,** (1993) Estimative of gene flow *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 353-373
- McDonald, B. A.** (1997) The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453.1997.
- McDonald, B. A.; Linde, C.** (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual. Rev. of Phytopathology* 40: 349-379
- McDonald, B. A.; Zhan, J.; Burdon, J. J.** (1999) Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology.* v. 89, p. 639-645
- McPherson, M. G.; Jenkins, J. N.; Watson. C. E.; McCarty, J. C.** (2004) inheritance of root-knot nematode resistance in M-315 RNR and M78-RNR cotton. *J. Cotton Sci.* 8:154-161
- Mei, M., Syed, N., Gao, H.W., Thaxton, P.M., smith, C.W., Stelly, D.M., and Chen, Z.J.** (2004). Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton (*Gossypium*). *Theor. Appl. Genet.*, 108: 280-291
- Miranda, J. E Suassuna, N. D.** (2004) *Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro*. Documento 254. Embrapa Algodão
- Nei, M.** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* v. 70, n. 12, 9. 3321-3323
- Nei, M.** (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York, USA: Columbia Universiti Press
- Nguyen,T.B.; Giband,M.;Brotier,P.; Risterucci, A. M.; Lacape, J.M.** (2004) Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theor. And Appl. Genetics* 109:167-175
- Nurnberger, T.; Nennstiel, D.; Jabs, T. Sacks, W. R.; Hahlbrock, K.; Schell, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defence responses. *Cell.* 78:449-460
- Paran, I., Goldman, S., Tanksley, S. D. e Zamir, D.** (1995). Recombination inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 90:542-548

- Paterson, A. H. e Smith.** (1999) Future horizons: Biotechnology for cotton improvement, In Smith C. W. and Cothren J. T. Ed. *Cotton. Origin, history, technology, and production*. John Wiley e Sons, New York. p. 415-432"
- Paterson, A.H., Saranga, Y., Menz, M., Jiang, C., e Wright, R.J.** (2003). QTL analysis of genotype X environment interactions affecting cotton fiber quality. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 384-396
- Peever, T. L. e Milgroom, M. G.** (1994) Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84: 515-519
- Percival, A. E.; Wendel, J. F.; Stewart, J. M.** (1999) Taxonomy and germoplasm resources. In: Smith C. W. and Cothren J. T. Ed. *Cotton; Origin, history, technology, and production*. Wiley, New York, pp 33 –63
- Péros, J.P.e Berger, G.** (2003) Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata* *J. Plant Pathology* 109: 909-919
- Punit Mohan, Mukewar, P. M. Sheo Raj e Singh, V. V.** (1997) Anatomy of *Gossypium arboreum* lines immune to grey mildew disease. *J. Cotton Res. & Dev.* 11: 191-195
- Rahman, R.-U., Aslam, N., Asif, M., Malik, T.A., e Zafar, Y.** (2002) Identification of markers for cotton leaf curl disease. *Cotton Science* 14 (suppl.): 17
- Ratayah, Y.** (1976) Reaction of cotton species and cultivars to four isolates of *Ramularia areola* *Phytopatology* 66: 1007-1009
- Reddy, O. U. K., Pepper, A. E., Abdurakhmonov, I., Saha, S., Jenkins, J. N., Brooks, T., Bolek, Y. e El-Zik, K. M.** (2001). New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. *Journal of Cotton Science*, 5:103-113
- Reinisch, A., Dong, J.M., Brubaker, C.L., Stelly, D.M., Wendel, J.F., e Paterson, A. H.** (1994). A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics*, 138: 829-847
- Risterucci, A.-M.; Grivet, L.; N'goran, J.A.K.; Pleretti, I.; Flament, M.-H.;Lanaud, C.** (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 948–955.

- Rong, J., Abbey, C., Bowers, J.E., Brubaker, C.L., Chang, C., Chee, P.W., Delmonte, T.A., Ding, X., Garza, J.J., Marler, B.S., Park, C.-H., Pierce, G.J., Rainey, K., M., Rastogi, V.K., Schulze, S.R., Trolinder, N.L., Wendel, J.F., Wilkins, T.A., Williams-coplin, T.D., Wing, R.A., Wright, R.J., Zhao, X., Zhu, L., e Paterson, A.H. (2004). A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics*, 166: 389-417.
- Shappley, Z. W.; Jenkins, J. Zhu, J. C. McCarty Jr. (1998a) Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of upland cotton, *J. Cotton Sci.* 2: 153-163
- Shappley, Z., Jenkins, J.N., Zu, J., e Mc Carty, J.C.Jr (1998b). Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of Upland cotton. *J. Cot. Sci.*, 2: 153-163
- Shappley, Z.W., Jenkins, J.N., meredith, W.R., e MCCarty, J.C., Jr. (1998a). An RFLP linkage map of Upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 756-761
- Shen X, Zhang T, Guo W, Zhu X, Zhang X. (2006). Mapping fiber and yield QTLs with main, epistatic, and QTL x environment interaction effects in recombinant inbred lines of upland cotton. *Crop Sci.*, 46: 61-66
- Shivankar, S. K.; Anvikar, D. G. E ninawe, B. N. (1995) Detection of physiological races of *Ramularia areola* Atk. Causing grey mildew of cotton. Short Communication *Sci. And Crop.* 5: 178-179
- Shivankar, S.K. e Wangikar, P.D. (1992) Estimation of crop losses due to grey mildew disease of cotton caused by *Ramularia areola*. *Indian Phytopathology*, v.45, n.1, p.74-76, 1992.
- Shuster, I. e Cruz, D. C. (2004) *Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados*. Ed. UFV. Viçosa
- Song X.L.; Guo W.Z.; Han Z.G.; Zhang T.Z. (2005). Quantitative trait loci mapping of leaf morphological traits and chlorophyll content in cultivated tetraploid cotton. *Journal of Integrative Plant Biology* 47(11): 1382-1390
- Suassuna, N. D. (2005) Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e seleção para resistência genética em algodoeiro. Tese. Viçosa-MG, Brasil.
- Tanksley, S. D. (1993) Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205-233

- Tanksley, S. D.; Ganai, M.W.; Prince, J. P.; Dvicente, M.C.; Bonierbale, M. W.** (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-60
- Thomas, E.** (2006) Analyse d use populations de linées recombinantes de cotonnier par marqueurs microsatellites. Tese. *Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse*, Toulouse.França
- Ulloa, M., e Meredith, W.R., Jr.** (2000). Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in intraspecific population. *J. Cot. Sci.*, 4: 161-170
- Ulloa, M.; Stewart, J. McD, Garcia, C. E.; Godoy, A. S.; Gaytan, M. A.; Acosta, N. S.** (2006) Cotton genetic resources in the western states of Mexico; In situ conservation status and germoplasm collection for ex situ preservation. *Genet Resour Crop Evol* (in press). DOI 10.1007/s10722-004-2988-0
- Utiamada, C. M.; Lopes, J. C.; Sato, L. N.; Roim, F. L. B.; Kajihara, L.; Occhiena, E. M.** (2003) Controle químico da ramularia (*Ramularia areola*) e ferrugem (*Phakopsora gossypii*) na cultura do algodoeiro. IN: *Congresso Brasileiro do Algodão*, 4., Goiânia. Algodão, um mercado em evolução – Anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, CD-ROM.
- Vallejos, C. E.e Tanksley, S. D.** (1983) Segregation of isozymes markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 66: 241-47
- Van Der Plank, J. E.** (1968) Disease resistance in plants. *Academic Press*. New York. San Francisco. London
- Vidal, M.S.; Bezerra, C. DE S.; Suassuna, N. D.; Hoffmann, L.V.** (2005). Comparação entre protocolos de extração de DNA para *Ramularia areola*. Comunicado Técnico 240 - Embrapa-Junho. Campina Grande –PB. 4p.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M. Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiner, M. e Zabeau, M.** (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. V. 23, (21):4407-4414
- Wang, B.; Brubaker, C. L.; Tate, Woods, W. J.; Matheson, B. A.; Burdon, J. J.** (2006) Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. *Plant Pathology* 55:746-753

- Wang, C.; Ulloa, M.; Roberts, P. A.** (2006) Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn1*) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L) *Theor. Appl Genetic* 112:770-777
- Wang, G. L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S., Champoux, M. C. e Nelson, R. J.** (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durable resistant rice cultivar. *Genetics*, 136:1421-1434
- Weissebach, J.; Gyapay, G.; Dib, C.; Vignal, A; Morissete, J.; Millasseau, P.; Vavysseix, G.; e Lathrop, M.** (1992) A Second generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359:794-801
- Wendel. J.** (2006) In: <http://www.eeob.instate.edu/faculty/wendell/home.htm>
- Wright, R.J., Thaxton, P.M., El-Zik, K.M., e Paterson, A.H.** (1998). D-subgenome bias of Xcm resistance genes in tetraploid *Gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution. *Genetics*, 149: 1987-1996
- Wright, S.** (1951) The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*. v15. p. 395-420
- Xu, Y., Zhu, L., Huang, N. e McCouch, S.** (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 253:535-545
- Zhang, T.; Yuan, Y.; Yu, J.; Guo, W. Kohel, R. J.** (2002) Molecular tagging of a major QTL for fibre strength in upland cotton and its marker-assisted selection, *Theor. Appl. Genet.* 106: 262-268
- Zhang, T.Z., Yuan, Y., Yu, J., Guo, W., e Kohel, R.J.** (2003). Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 262-268