

COMPORTAMENTO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *RAMULARIA AREOLA*

Inês Roeder Nogueira Mendes¹, João Paulo Ascari^{2*}, Jurandir Ambrósio³, Dejânia Vieira de Araújo⁴, Rafael Sbruzzi Prieto⁵, Rodolfo Luis Cardoso Tavares⁵

¹ Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Sistemas de Produção Agrícola – PPGASP, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra - MT.

² Mestre em Ambiente e Sistemas de Produção Agrícola – PPGASP, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra - MT. E-mail: joaoascari@hotmail.com

³ Engenheiro Agrônomo, Prefeitura Municipal de Aripuanã, Aripuanã - MT.

⁴ Professora Doutora em Agronomia - Fitopatologia, docente na Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra - MT.

⁵ Graduando em Agronomia, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra - MT.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da temperatura e meios de cultura no índice de velocidade de crescimento micelial, produção de conídios e morfologia do fungo *Ramularia areola*. O estudo foi conduzido em condições de laboratório, com delineamento inteiramente casualizado, tendo quatro temperaturas e sete meios de cultura. Após o preparo de cada meio de cultura em placas de Petri, foi realizado a inoculação do fungo com discos de 2 mm de diâmetro contendo *R. areola*. As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas com fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro, com as respectivas temperaturas de cada tratamento. Foi avaliado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), número de conídios (NC) e características morfológicas de *R. areola*. Houve interação significativa entre os meios de cultura e temperatura para as variáveis IVCM e NC de *R. areola*, onde o meio que favoreceu o IVCM foi Arroz-Ágar (AA), enquanto que, o NC foi superior nos meios BDA e Suco vegetal – (V8). O aspecto morfológico do fungo sofreu alterações evidentes na temperatura de 24°C e em função dos meios de cultura. Com isso, verificou-se que as temperaturas 24 e 28°C, os meios de cultura AA, BDA e V8 promoveram maior IVCM e NC de *Ramularia areola*.

Palavras-chave: Mancha de Ramulária. Meio de cultura. Temperatura.

IN VITRO BEHAVIOR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *RAMULARIA AREOLA*

ABSTRACT: The fungus *Ramularia areola* presents destructive potential in the cotton crop, being economically important in Brazilian agribusiness, so it is necessary to know the behavior of this fungus. The objective of this study was to evaluate the effects of temperature and culture medium on the rate of mycelial growth rate, conidial production and morphology of the fungus *Ramularia areola*. The study was conducted under laboratory conditions, with a completely randomized design, with four temperatures and seven culture medium. After preparation of each culture medium in Petri plates, the inoculation was performed with 2 mm

diameter discs containing *R. areola*. The plates were sealed with PVC film and incubated with photoperiod 12 h light and 12 h dark, with the respective temperatures of each treatment. The mycelial growth rate index (MGRT), number of conidia (NC) and morphological characteristics of *R. areola* were evaluated. There was significant interaction between the culture medium and temperature for the MGRT and NC variables of *R. areola*, where the culture medium that favored the MGRT was Rice-Agar (RA), while the NC was higher in the PDA and Vegetable Juice - (V8). The morphological aspect of the fungus underwent evident changes in the temperature of 24°C and in function of the culture medium. With this, it was found that temperatures of 24 and 28°C, the culture medium RA, PDA and V8 promoted higher MGRT and NC of *Ramularia areola*.

Key words: *Ramularia* leaf spot. Culture medium. Temperature.

INTRODUÇÃO

Atualmente a mancha de ramulária (*Ramularia areola* (Atk.), [teleomorfo *Mycosphaerella areola* (J. Ehrlich & F. A. Wolf)] é um relevante problema na cotonicultura brasileira, em especial na região dos cerrados. Como agravante da situação, os extensos cultivos de algodão, são realizados em sua maior parte, na forma de monocultura, e muitas vezes, utilizando cultivares com baixo grau de resistência a este fungo. Além disso, a região Centro-Oeste brasileira tem como características climáticas, elevados índices de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar, favoráveis ao progresso da mancha de ramulária (CIA *et al.*, 2013; PIZZATO *et al.*, 2014).

A doença causa desfolha precoce da planta, sendo mais severa no baixeiro, com isso, pode promover redução na produtividade do algodoeiro em cerca de 30% em cultivo safra e 20% em safrinha, quando medidas eficientes de controle não são adotadas (ASCARI *et al.*, 2016). Para o manejo dessa doença é necessário a integração de práticas, utilizando cultivares com maior grau de resistência associado ao controle com fungicidas, pois somente o controle químico de forma isolada, pode necessitar de mais de 12 aplicações durante o ciclo da cultura (STEFANELO *et al.*, 2016). Algumas técnicas culturais auxiliam no manejo dessa doença, tais como a adubação equilibrada e maior rigor nas aplicações de reguladores de crescimento, observando sempre a fase fisiológica da cultura (CIA; SALGADO, 2005).

Dessa forma, a busca por cultivares mais resistentes e produtivas tem sido intensificada nos estudos de melhoramento genético, e como ferramenta de auxílio a esses estudos, é fundamental o entendimento e domínio das técnicas de incubação e esporulação do patógeno em ambiente artificial (NOVAES *et al.*, 2011). Pois, a capacidade epidemiológica de *R. areola* é bastante influenciada pela esporulação e pelos mecanismos de disseminação das estruturas do patógeno, sendo esses processos dependentes das condições climáticas de cada região, tais como a temperatura (PIZZATO *et al.*, 2013; PIZZATO *et al.*, 2014).

Estudos em diferentes patossistemas vem sendo realizados visando o melhor desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos, como Hanada *et al.* (2002) com *Mycosphaerella fijiensis*, Melo e Reis (2010) analisando esporulação de *Corynespora cassiicola*, Galbieri *et al.* (2015) com isolados de *R. areola* e Gomes e Pena (2016) trabalhando com o fungo *Quambalaria* sp..

Apesar da grande importância de *R. areola* para a cotonicultura brasileira e mundial, são poucas as pesquisas visando a caracterização *in vitro* deste patógeno. Esses estudos buscam conhecer as características do fungo em cultivo *in vitro*, entender melhor seu desenvolvimento e esporulação, principalmente quando submetido as interferências ambientais, como condições de temperatura, luminosidade e substrato (GIROTTO *et al.*, 2013; VOLPONI *et al.*, 2014; GALBIERI *et al.*, 2015). Por isso, almeja-se determinar a variabilidade patogênica de *R. areola* e suas características nas condições edafoclimáticas de Mato Grosso (MEHTA *et al.*, 2016)

Entretanto, é fundamental o conhecimento laboratorial de características morfológicas das colônias, micélios e conídios do patógeno. Para isso, necessita-se determinar os substratos apropriados para o crescimento e desenvolvimento do fungo, que são bastante influenciados pela composição do meio de cultura e temperatura de incubação (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Conforme Curvelo *et al.* (2010), a temperatura ótima para a germinação e o desenvolvimento do tubo germinativo do fungo *R. areola* varia de 25 a 30°C.

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da temperatura e de meios de cultura no índice de velocidade de crescimento micelial, produção de conídios e morfologia do fungo *Ramularia areola*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado de Mato Grosso, em Tangará da Serra - MT. O isolado de *R. areola* foi obtido de folhas de algodoeiro cultivado em condições de campo, com sintomas característicos da mancha de ramulária. O patógeno foi isolado de folhas de algodão, sendo inicialmente desinfestadas superficialmente com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, e lavadas com água destilada esterilizada. Após a identificação do fungo, estruturas com conídios foram retiradas das folhas e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em seguida, foram cultivadas por cinco dias a 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 h para multiplicação do inóculo do fungo.

O experimento foi conduzido utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com análise fatorial duplo (4 x 7), tendo quatro temperaturas e sete meios de cultura, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As temperaturas foram determinadas dentro da amplitude térmica que favorece o desenvolvimento do patógeno em condições de campo, que varia entre 20 e 30°C (CURVELO *et al.*, 2010). Portanto, foram consideradas as temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C.

Os meios de cultura testados foram: I: BDA - Batata-Dextrose-Ágar (20 g de dextrose, 20 g de ágar, 500 mL de caldo de batata e 500 mL de água destilada); II: Suco Vegetal (V8) - meio de ágar com suco V8 (200 mL de V8-Campbel Soup Company, 3 g de CaCO₃, 17 g de ágar e 800 mL de água destilada); III: EMA - Extrato de malte ágar (25 g de extrato de malte, 17 g de ágar e 1.000 mL de água destilada); IV: EVA - Extrato vegetal ágar (20 g de dextrose, 20 g de ágar, 500 mL de extrato vegetal de folhas sadias do terço superior da planta de algodão com 40 dias após emergência e 500 mL de água destilada); V: KM - Kirchoff Modificado (30 g de dextrose, 0,5 g de asparagina C₄H₈N₂O₃, 1 g de sulfato de potássio K₂SO₄, 0,5 g de sulfato de magnésio MgSO₄ 7 H₂O, 20 g de ágar); VI: AA - Arroz ágar (500 mL do caldo de 50 g de arroz cozido, 20 g de dextrose e 20 g de ágar) e VII: DPA - Dextrose peptona ágar (10 g dextrose, 20 g de ágar, 2 g de peptona, 0,5 g de fosfato de potássio monobásico anidro KH₂PO₄ e 0,5 g de sulfato de magnésio MgSO₄ 7 H₂O).

Depois de preparados, os meios de cultura foram vertidos e frascos de vidro e autoclavados a 127°C por 20 min. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foi vertido 20 mL de cada meio em placas de Petri. Para a inoculação do fungo nos diferentes meios, foi retirado um disco de 2 mm de diâmetro de *R. areola* com cinco dias de incubação, e depositados no centro de cada placa de Petri, com os respectivos meios de cultura de cada tratamento. Todas as placas foram seladas com filme PVC e mantidas em incubadora tipo B.O.D, de acordo com a temperatura de cada tratamento, ambas em regime luminoso de 12 h luz por 12 h escuro.

As avaliações do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) tiveram início 24 h após a incubação, sendo diariamente realizadas medições dos dois eixos ortogonais do diâmetro das colônias, com paquímetro digital. Com os dados de cada tratamento, foi calculado IVCM a partir da Eq. 1, descrita por Oliveira (1992):

(Eq.1)

$$IVCM = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde D - diâmetro médio atual da colônia (mm), D_a - diâmetro médio da colônia do dia anterior (mm) e N - número de dias após a inoculação. A avaliação de IVCM foi finalizada no sexto dia de incubação, onde foi observado crescimento completo de uma das colônias.

Logo após a última avaliação do IVCM, foram realizadas as avaliações da produção de conídios. Para isso, retirou-se cinco discos de 5 mm de diâmetro das regiões centrais e laterais de cada colônia, e colocados em Becker de 20 mL, contendo 10 mL de água destilada estéril e Tween-80 a 0,001%, sendo agitado por dois minutos para desagregação dos conídios. Em cada placa de Petri foi realizada quatro contagens de esporos na câmara de Neubauer, contabilizando o número de esporos mL⁻¹. Foram contabilizados apenas os esporos característicos de *R. areola*, conforme a descrição realizada por Volponi *et al.* (2014).

Para as características morfológicas das colônias do fungo *R. areola*, foi adaptada a metodologia de realizada por Sussel (2005). Para estimar a coloração da colônia foi realizado

avaliações de coloração durante o crescimento do micélio em cada tratamento. O aspecto da colônia foi avaliado por observações do comportamento do crescimento micelial, considerando-se a densidade do micélio e altura da colônia do fungo. Na formação de setores, foi contado a quantidade média de setores formados pelas colônias em cada tratamento.

Os dados do índice de velocidade de crescimento micelial e da produção de conídios foram analisados pelo teste F, seguido da análise de regressão ($p < 0,05$) por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre meios de cultura e temperaturas para as variáveis índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). O crescimento médio das colônias em todos os meios foi de $10,92 \text{ mm dia}^{-1}$, tendo o menor crescimento no meio BDA ($9,54 \text{ mm dia}^{-1}$) e KM ($8,83 \text{ mm dia}^{-1}$), e maior no meio AA ($13,30 \text{ mm dia}^{-1}$), onde este último, apresentou desenvolvimento completo na placa de Petri com seis dias após a incubação (Figura 1).

Ao analisar o efeito da temperatura, percebe-se que a incubação a 32°C restringiu a velocidade de crescimento micelial de *R. areola* em todos os meios de cultura. Com exceção dos meios BDA (maior IVCM a 24 e 28°C) e KM (maior IVCM a 28°C), os demais meios de cultura tiveram maior IVCM nas temperaturas variando entre 20 e 28°C (Figura 1). Para ser mais preciso, a partir do ponto de máxima (PM) podemos verificar a temperatura exata em que ocorreu maior IVCM em função de cada meio, sendo $25,60$; $24,35$; $24,58$; $23,99$; $25,42$; $24,42$ e $23,91^\circ\text{C}$ para BDA, V8, EMA, EVA, KM, AA e DPA, respectivamente.

Em relação a temperatura, a partir dos dados observados neste estudo no cultivo *in vitro* da fase assexuada do fungo (*Ramularia areola*), constatou-se maior desenvolvimento em uma faixa de temperatura variando entre 20 e 28°C . Tais resultados estão em conformidade com Mehta *et al.* (2016), onde realizaram o cultivo *in vitro* da fase sexual deste mesmo fungo (*Mycosphaerella areola*) utilizando temperatura de 21°C , considerada adequada.

A partir deste comportamento do fungo perante as condições de temperatura, podemos também relacionar com o comportamento da doença a campo. Devido ao fungo ter sido favorecido por temperaturas mais amenas em ambiente controlado, pode dar suporte aos resultados verificados por Ascari *et al.* (2016a; 2016b), onde encontraram os maiores valores de área abaixo da curva de progresso de severidade de *R. areola* no terço inferior das plantas. Que de acordo com Johnson *et al.* 2013, o microclima nessa região da planta apresenta condições térmicas variando entre 20 e 30°C , sendo ideal ao desenvolvimento e esporulação do patógeno.

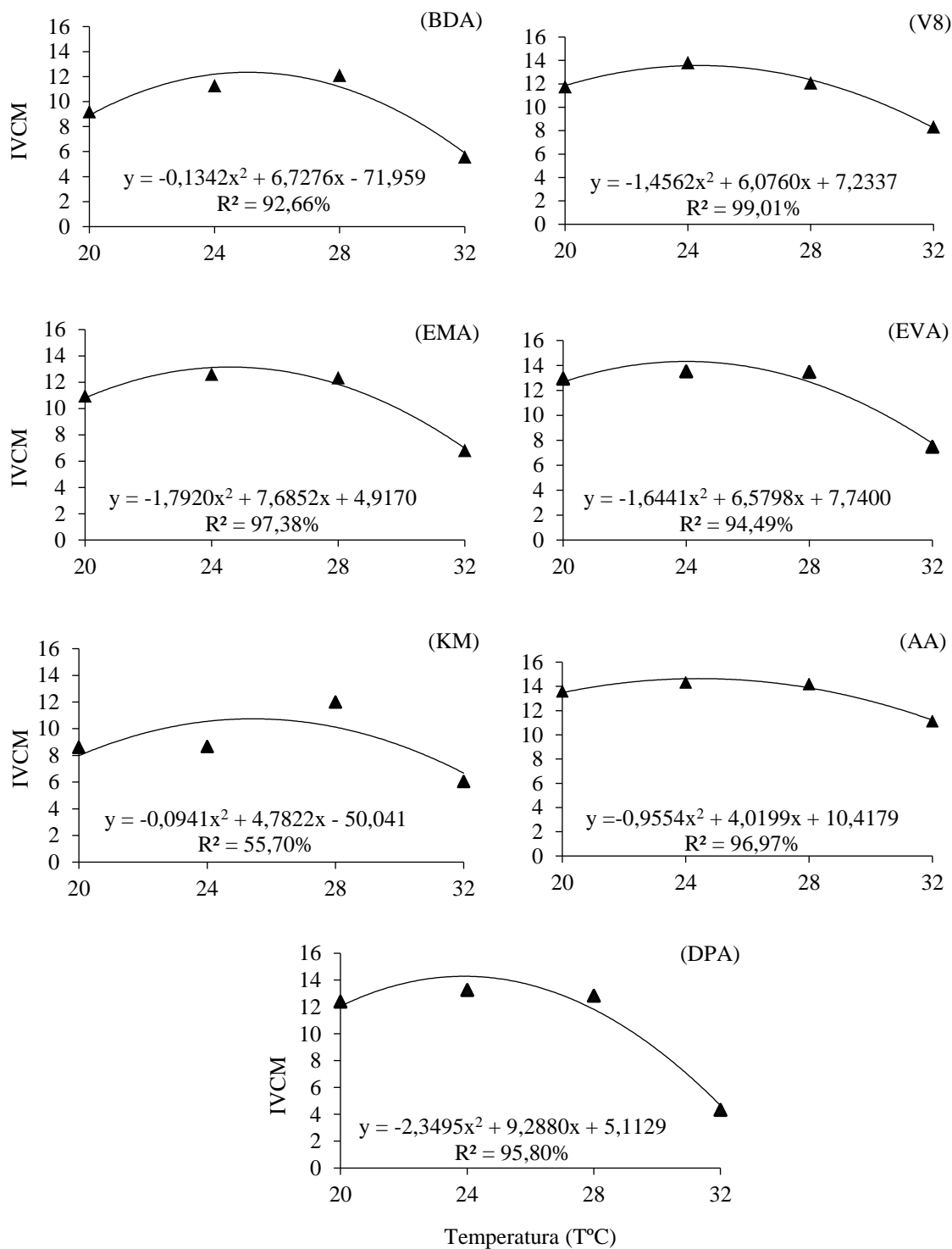


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Ramularia aerola* com os meios Batata-dextrose-ágar (BDA); Suco Vegetal (V8); Extrato de Malte Ágar (EMA); Extrato Vegetal Ágar (EVA); Kirchoff Modificado (KM); Arroz Ágar (AA); Dextrose-Peptona-Ágar (DPA) nas temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

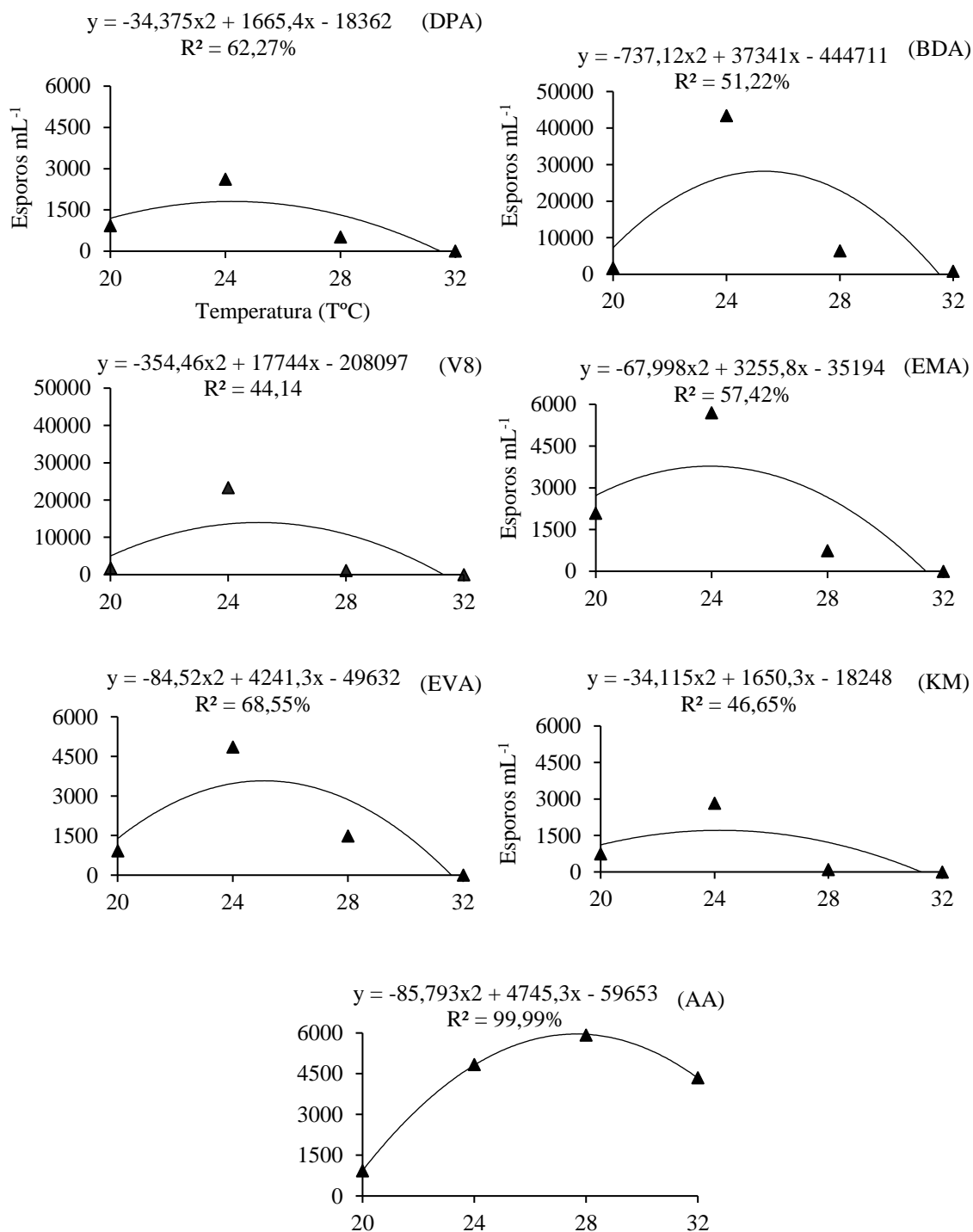


Figura 2. Número de conídios do isolado de *Ramularia aerola* com os meios Batata-dextrose-água (BDA); Suco Vegetal (V8); Extrato de Malte Água (EMA); Extrato Vegetal Água (EVA); Kirchoff Modificado (KM); Arroz Água (AA); Dextrose-Peptona-Água (DPA) e temperaturas de 20, 24, 28 e 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Em relação aos meios de cultura, os resultados encontrados diferem dos observados por Gomes e Pena (2016), pois estudando o fungo *Quambalaria eucalypti* (M.J. Wingf., Crous & **Cultura Agrônômica**, Ilha Solteira, v.26, n.3, p.456-468, 2017

W.J. Swart) encontraram maior IVCM no meio BDA, seguido do meio V8. Essas diferenças conforme os mesmos autores, ocorrem devido composição nutricional característica de cada meio de cultura, pois as mesmas podem ou não promover estímulos ao desenvolvimento e crescimento do micélio.

Ocorreu interação significativa entre os meios de cultura e as temperaturas para a variável número de conídios (NC). Os meios de cultura que influenciaram em maior NC na temperatura de 24°C foram BDA e V8, respectivamente, enquanto que a 28°C os meios BDA e AA tiveram maior produção de conídios. Os demais meios apresentaram baixa indução a esporulação do fungo, já no meio KM não ocorreu produção de esporos. Por esse motivo, os meios EMA, EVA, KM, AA e DPA não são indicados para o cultivo *in vitro* de deste isolado de *R. areola* em condições de laboratório. O efeito da temperatura foi evidente somente nos meios BDA e V8, que tiveram maior NC na temperatura de 24°C (Figura 2).

Observou-se que os meios de cultura que favoreceram o IVCM (meio AA) não foram os mesmos que estimularam a esporulação e produção de conídios (meios BDA e V8) de *R. areola*. Quanto a isso, Nozaki *et al.* (2004) comentaram que nem sempre os mesmos meios favorecem ao mesmo tempo a produção de hifas e conídios do fungo, pois de acordo com Gomes e Pena (2016), as diferenças nutritivas e a complexidade dos carboidratos influenciam nas fases de desenvolvimento do fungo. Ainda de acordo com Cruz *et al.* (2009), a composição e concentração de nutrientes no substrato, o requerimento nutricional e a variabilidade fisiológica do isolado, além das condições ambientais, podem influenciar a multiplicação de conídios de fungos fitopatogênicos.

Para Galbieri *et al.* (2015), além das características já mencionadas acima, o potencial de esporulação depende do isolado e da temperatura, sendo que, nos estados de Mato Grosso e Goiás, a maior esporulação de *R. areola* ocorreu na temperatura de 23°C, não tendo produção de conídios em temperaturas próximas de 33°C. Assim como verificado neste estudo, isso prova que este fungo não se desenvolve adequadamente em altas temperaturas, pois, além do reduzido crescimento micelial, não produz estruturas de disseminação.

A adição de folha de algodão na composição do meio de cultura, como no EVA, esperava-se um estímulo na esporulação do fungo, porém, isso não ocorreu (Figura 2). Essa mesma técnica foi relatada por Nozaki *et al.* (2004), onde verificaram a influência do meio de cultura no crescimento micelial e produção de picnídios de *Diaporthe citri*.

Os efeitos das temperaturas não foram evidentes sobre a morfologia de *R. areola*, porém, houve grande variação morfológica entre os meios de cultura testados. Com base na Tabela 1 e Figura 3, é possível verificar as características descritivas do fungo em função de cada meio de cultura, onde observou-se que apesar de diferenças quanto a coloração, os meios de cultura BDA, V8 e DPA apresentaram alta produção e denso micélio.

Tabela 1. Caracterização morfológica da colônia de *Ramularia areola* em diferentes meios de cultura na temperatura de 24°C

| Meio de cultura ¹ | Coloração da colônia | Aspecto | Setores |
|------------------------------|----------------------|------------|---------|
| BDA | Branco | Alto-Denso | 2,33 |
| V8 | Branco-rosado | Alto-Denso | 5,00 |
| EMA | Branco | Alto-Ralo | 2,16 |
| EVA | Branco | Ralo | 0 |
| KM | Rosa | Ralo | 0 |
| AA | Branco | Ralo | 0 |
| DPA | Branco-rosado | Alto-Denso | 5,80 |

¹Batata-dextrose-ágar (BDA); Suco Vegetal (V8); Extrato de Malte Ágar (EMA); Extrato Vegetal Ágar (EVA); Kirchoff Modificado (KM); Arroz Ágar (AA); Dextrose-Peptona-Ágar (DPA).

Segundo Volponi *et al.* (2014), essa variação no aspecto morfológico pode ocorrer quando se faz uso de subcultivos repetidos do mesmo isolado, e também quando se utiliza diferentes meios de cultura, pois é possível que o fungo sofra alterações nas características culturais e morfológicas.

Neste estudo, a colônia de *R. areola* que apresentou maior NC foi no meio BDA tendo coloração esbranquiçada (Figura 3). Conforme Volponi *et al.* (2014), as colônias que produzem mais conídios, são as que mudam da coloração rosa claro para a cor branca. Essa variação entre os meios de cultura ainda não foi relatada na literatura para *R. areola*, apesar disso, já se sabe que os isolados deste fungo de diferentes regiões geográficas variam quanto as características morfológicas e a esporulação (VOLPONI *et al.*, 2014; GALBIERI *et al.*, 2015; MEHTA *et al.*, 2016).

Com isso, ficou evidente a influência que a temperatura e as diferenças nutricionais de substratos podem exercerem sobre o desenvolvimento e morfologia do fungo *R. areola* em condições de laboratório. Esses dados podem auxiliar nas explicações referentes ao comportamento deste patógeno em condições de campo, influenciando nas tomadas de decisões e escolha das práticas de manejo.

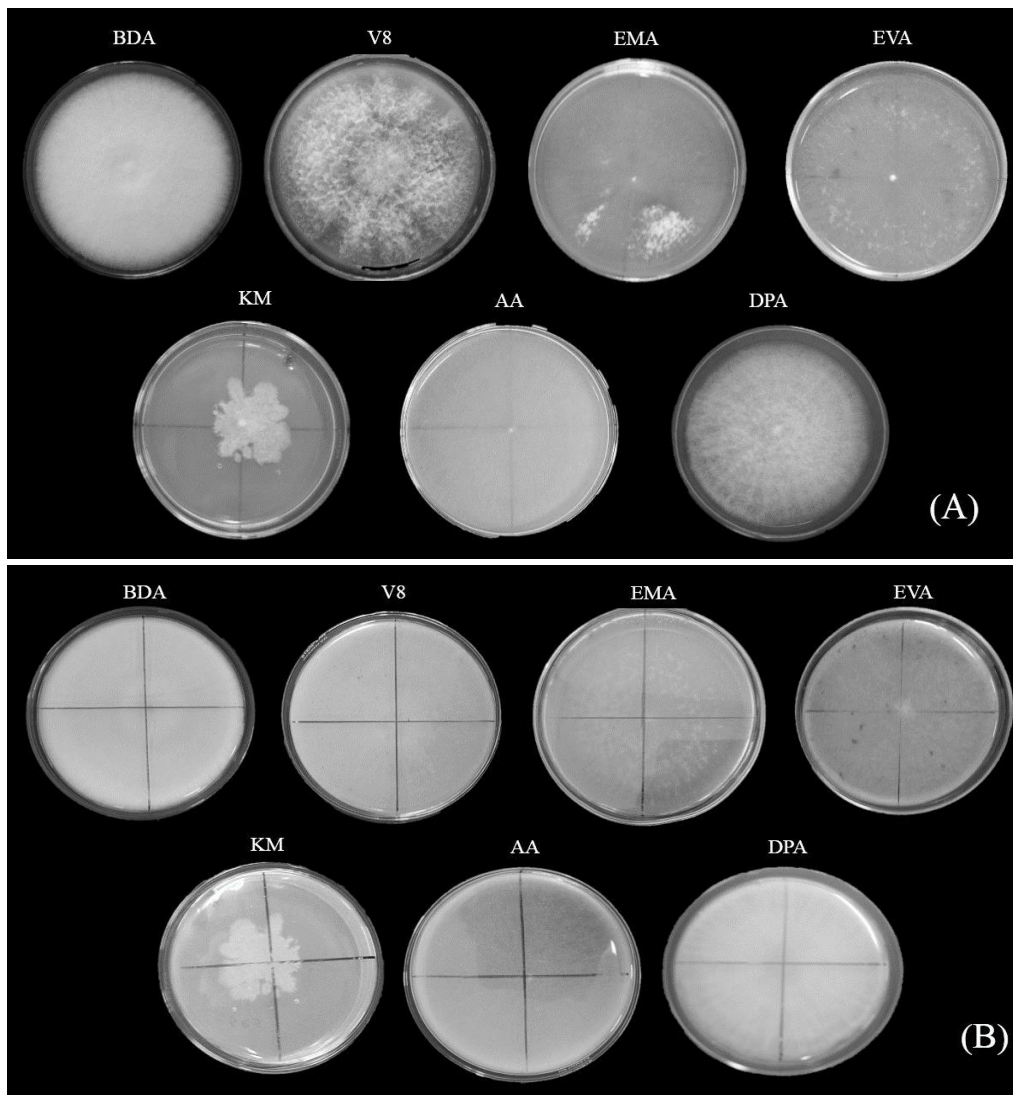


Figura 3. Aspecto morfológico e coloração de colônias de *Ramularia aerola* na superfície (A) e abaixo (B) da placa de Petri, com os meios Batata-dextrose-ágar (BDA); Suco Vegetal (V8); Extrato de Malte Ágar (EMA); Extrato Vegetal Ágar (EVA); Kirchoff Modificado (KM); Arroz Ágar (AA); Dextrose-Peptona-Ágar (DPA).

CONCLUSÃO

As temperaturas de 24 e 28°C apresentaram maior índice de velocidade e crescimento micelial e número de conídios de *Ramularia areola*.

O meio de cultura que mais estimulou o índice de velocidade de crescimento micelial foi o Arroz-Ágar, enquanto que o número de conídios foi maior com os meios Batata-dextrose-ágar (BDA) e Suco Vegetal - V8.

O aspecto morfológico de *Ramularia areola* foi afetado pelos diferentes meios de cultura, não tendo efeitos da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASCARI, J. P.; ARAÚJO, D. V.; DIAS, L. D. E.; BAGATINI, G. J.; MENDES, I. R. N. Severity of ramularia leaf spot and seed cotton yield in different sowing times. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p.603-610, 2016a.

ASCARI, J. P.; MENDES, I. R. N.; SILVA, V. C.; ARAÚJO, D. V. Ramularia leaf spot severity and effects on cotton leaf area and yield. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 4, p.434-441, 2016b.

CIA, E.; FUZZATTO, M. G.; KONDO, J. I.; OHL, G. A.; GALBIERI, R. Reação de genótipos de algodoeiro à mancha de ramulária em diferentes épocas e ambientes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p.193-197, 2013.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. (eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo. Agronômica Ceres, 2005. cap. 6, p.41-52.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1562-1564, 2009.

CURVELO, C. R. S.; RODRIGUES, P. G. B.; BERGER, P. G.; REZENDE, D. C. Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p.108-113, 2010.

DHINGRA, O.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1995. 434 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.

GALBIERI, R.; CIA, E.; MORELLO, C. L.; FANAN, S.; JUNIOR, E. R. A.; KOBAYASTI, L. *Ramularia areola* sporulation potential in Brazilian cotton. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 3, p.233-235, 2015.

GIROTTO, L.; MARANGONI, M. S.; MATOS, J. N.; GALBIERI, R.; ALMEIDA, W. P.; MEHTA, Y. R. Identification of phenotypic and genotypic variability among the isolates of *Ramularia areola* of Brazilian cotton. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 4, n. 9, p.1893-1898, 2013.

GOMES, E. M. C.; PENA, R. C. M. Isolamento, caracterização morfológica e avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura de cepas do fungo *Quambalaria* sp. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 6, n. 4, p.59-63, 2016.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p.170-173, 2002.

JOHNSON, I.; RAMJEGATHESH, R.; KARTHIKEYAN, M.; CHIDAMBARAM, P. Epidemiology of grey mildew and *Alternaria* blight of cotton. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Camberra, v. 46, n. 18, p.2216-2223, 2013.

MEHTA, Y. R.; GALBIERI, R.; MARANGONI, M. S.; BORSATO, L. C.; RODRIGUES, H. P.; PEREIRA, P.; MEHTA, A. *Mycosphaerella areola* - The Teleomorph of *Ramularia areola* of cotton in Brazil, and its epidemiological significance. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 7, n. 10, p.1415-1422, 2016.

MELO, M. M.; REIS, E. M. Effect of substrates, light and filter paper on *Corynespora cassiicola* sporulation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p.251-253, 2010.

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

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p.429-432, 2004.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Prática**, Bebedouro, v. 16, n. 1, p.42-47, 1992.

PIZZATO, J. A.; ARAÚJO, D. V.; SERAFIM, M. E.; ARAÚJO, K. L.; DALLACORT, R.; GÍLIO, T. A. S.; JÚNIOR, J. R.; MACIEL, V. A. Epidemiologic study of *Ramularia areola* under different soil covers and spacings, for cotton crops. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 4, n. 11, p.2049-2059, 2013.

PIZZATO, J. A.; ARAÚJO, D. V.; GALVANIN, E. A. S.; JÚNIOR, J. R.; MATOS, A. N. A.; VECCHI, M.; ZAVISLAK, F. D. Geostatistics as a methodology for studying the spatiotemporal dynamics of *Ramularia areola* in cotton crops. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 9, p.2472-2479, 2014.

STEFANELO, M. S.; OHL, G. A.; TAKIZAWA, E. K. *Ramularia areola*: Agressiva e Frequente. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, Pelotas, v. 16, n. 201, p.11-13, 2016.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum legrenarium*, agente causal da antracnose da cucurbitáceas**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, -Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Escola de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

VOLPONI, J.; MATOS, J. N.; GIROTTO, L.; MARANGONI, M. S.; GALBIERI, R.; MEHTA, Y. R. Spore Types and Spore Production of *Ramularia areola* for Screening Cotton

Cultura Agronômica, Ilha Solteira, v.26, n.3, p.456-468, 2017

Germplasm for Resistance. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 1, p.2413-2417, 2014.