

VARIABILIDADE E ESTRUTURA DE VIRULÊNCIA EM *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA* EM SORGO

CARLOS R. CASELA¹, ALEXANDRE S. FERREIRA¹ & NELY BRANÇÃO²

¹Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. EMBRAPA, Caixa Postal 151, 35701-970. Sete Lagoas, MG.

²Centro de Pesquisa em Agricultura de Clima Temperado - EMBRAPA, Caixa Postal 403, 96001-970. Pelotas, RS.

(Aceito para publicação em 02/03/96)

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. & BRANÇÃO, N. Variabilidade e estrutura de virulência em *Colletotrichum graminicola* em sorgo. Fitopatol. bras. 21: 357-361. 1996.

RESUMO

Analisou-se a estrutura de virulência de duas populações de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo. Foram comparadas as frequências esperada e observada de virulência a todos os pares possíveis de genótipos de uma série diferencial formada por cinco linhagens B (mantenedoras) e oito linhagens R (restauradoras). Calculou-se também, para cada par de genótipos, um coeficiente de associação de patogenicidade (CAP) e um coeficiente de associação de virulência (CAV). A virulência apresentou-se

altamente associada em relação a 19 pares de linhagens. Tal fato é indicativo de que combinações destes genótipos através de cruzamentos resultariam em uma resistência de pouca durabilidade. Altos valores de CAP e baixos de CAV ocorreram em relação a 21 pares de genótipos, indicando que estas combinações são potencialmente efetivas como fonte de resistência durável a *C. graminicola*.

Palavras chave: antracnose, resistência durável, dissociação de virulência.

ABSTRACT

Virulence structure and variability in the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*

The virulence structure of two populations of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* was analysed. The observed and expected virulence frequencies to all possible pairs of sorghum genotypes of a differential set formed by 5 B (maintainers) lines and 8 R (restorers) lines were compared. For each pair, a virulence association coefficient (VAC) and a pathogenicity association coefficient (PAC) were also calculated. For 19 pairs of sorghum

lines, virulence was highly associated, indicating that such combinations would provide less durable resistance. On the other hand, high PAC and low VAC were observed for 21 pairs of sorghum genotypes, indicating that these are potentially effective combinations in providing durable resistance to *C. graminicola*.

INTRODUÇÃO

A antracnose, causada por *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson, é um sério problema para a cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*) no Brasil. Esta doença está presente em todas as áreas de plantio desta cultura, podendo causar severas perdas em genótipos suscetíveis sob condições ambientais favoráveis (Casela, 1992).

Colletotrichum graminicola é um patógeno que exhibe alta variabilidade nas condições brasileiras. A primeira constatação da existência de raças fisiológicas deste patógeno foi feita por Nakamura (1984); cinco raças foram identificadas com base na reação das cultivares Tx2536, Martin, TAM428, Brandes, SC175-14 e SC170-6-17 a isolados coletados em diferentes regiões do país. Posteriormente sete raças foram identificadas em sete isolados de *C. graminicola*, todos obtidos de locais diferentes, com base nas reações

apresentadas por 12 cultivares de sorgo (Ferreira & Casela, 1986).

Uma alta instabilidade patogênica foi observada em isolados de *C. graminicola*, através da avaliação de virulência de culturas e sub-culturas monospóricas obtidas das cultivares Tx623 e SC748-5, em cinco cultivares diferenciadoras. Culturas monospóricas obtidas de uma única lesão e sub-culturas obtidas a partir de uma cultura monospórica foram separadas em várias raças fisiológicas (Casela & Frederiksen, 1994).

Em patossistemas onde o agente patogênico apresenta uma alta variabilidade genética, a identificação de raças fisiológicas através da virulência em plantas diferenciadoras é, muitas vezes, de pouca utilidade em programas de melhoramento genético, devido ao grande número de raças identificadas a cada ano (Groth & Roelfs, 1987). Uma alternativa a este procedimento tem sido a caracterização da estrutura de virulência do patógeno, onde a associação ou dissociação de virulência a importantes genes de resistência no hospedeiro é o aspecto fundamental. Neste caso buscam-se combinações de genes ou de genótipos de resistência para os quais a virulência encontra-se dissociada na população do patógeno, na expectativa de se obter uma resistência de maior durabilidade (Browder & Eversmeyer, 1977; Vanderplank, 1982; Alexander *et al.*, 1984).

Informações sobre a estrutura de virulência da população de *C. graminicola*, em relação a 10 cultivares de sorgo indicaram a ocorrência de um alto grau de dissociação de virulência em relação aos genótipos Tx378 e SC748-5 (Casela & Ferreira, 1995). Combinações de genótipos ou de genes de resistência para as quais os correspondentes genes de virulência no patógeno estão dissociados, propiciam uma resistência de maior durabilidade (Browder & Eversmeyer, 1977; Alexander *et al.*, 1984).

O presente trabalho teve por objetivo obter informações sobre a variabilidade e a estrutura de virulência de *C. graminicola*, a partir de amostras de isolados obtidos de duas populações do patógeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados relativos à estrutura de virulência de *C. graminicola* foram obtidos nas áreas experimentais do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) - EMBRAPA, em Sete Lagoas, MG e do Centro de Pesquisa em Agricultura de Clima Temperado (CPACT) - EMBRAPA, em Pelotas, RS. Isolados de *C. graminicola* foram obtidos em plantas infectadas de uma população formada por uma mistura, em partes iguais, de oito linhagens elites restauradoras (R) e cinco linhagens elites macho-estéreis (A) do programa de melhoramento de sorgo do CNPMS (Tabela 1). Esta população foi semeada, em cada local, em uma área de aproximadamente 2000m².

Para a coleta de amostras, a população foi subdividida em 20 parcelas de aproximadamente 100m² e de cada parcela, foram coletadas ao acaso amostras de material infectado de 10-12 plantas. Na obtenção dos isolados monospóricos, espécimens coletadas foram esterilizadas superficialmente por dois minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a

TABELA 1 - Frequência de virulência de *Colletotrichum graminicola* a 13 genótipos de sorgo em amostras coletadas em Sete Lagoas (MG) e Pelotas (RS).

Cultivar	Frequência de Virulência	
	Sete Lagoas	Pelotas
CMSXS 112 B	0,29	0,38
CMSXS 142 B	0,98	0,98
CMSXS 210 B	0,00	0,02
CMSXS 211 B	0,85	0,76
CMSXS 212 B	0,76	0,78
CMSXS 116 R	0,39	0,22
CMSXS 169 R	0,13	0,07
CMSXS 173 R	0,38	0,08
CMSXS 178 R	0,37	0,09
CMSXS 179 R	0,73	0,59
CMSXS 180 R	0,72	0,55
CMSXS 181 R	0,68	0,57
CMSXS 182 R	0,40	0,23

0,5% e plaqueadas em meio de farinha de avicá e ágar (FAA). Em seguida, as placas foram incubadas sob luz fluorescente contínua a uma temperatura de 25°C por sete dias. Após este período, os conídios foram coletados pela adição de 10ml de água destilada em cada placa, seguindo-se da raspagem superficial do meio com o auxílio de uma espátula. A suspensão, assim obtida, sofreu uma diluição em série até à concentração de 50-100 conídios/ml. Em seguida, transferiu-se 1ml desta suspensão para uma placa de Petri contendo ágar-água a 2%, que foi incubada por um período de 12 horas, sob luz contínua, para a indução de germinação. Após este período os isolamentos monospóricos foram obtidos na proporção de um para cada planta amostrada, num total de 100 isolados por local.

As mesmas linhagens elites integrantes da mistura constituíram a série diferencial utilizada para a caracterização fenotípica dos isolados amostrados e para a obtenção de informações sobre a estrutura de virulência das populações do patógeno.

Os procedimentos adotados para produção, preparo de inóculo, inoculação e avaliação foram os mesmos descritos por Casela e Ferreira (1986).

Visando detectar a ocorrência de associações ou dissociações de virulência em relação a duas linhagens *a* e *b* da série diferencial, os isolados foram separados em cada uma das quatro categorias: VaVb - virulento a ambas as linhagens; VaAb - virulento à linhagem *a* e avirulento à linhagem *b*; AaVb - avirulento à linhagem *a* e virulento à linhagem *b* e AaAb - avirulento a ambas as linhagens. Para a análise dos dados, calculou-se a frequência de virulência, ou seja, a proporção de isolados na população amostrada com virulência, a cada linhagem individualmente e as frequências esperada (se a associação de virulência ocorre ao acaso), e obser-

vada de virulência a cada par de linhagem da série diferencial. Pretendeu-se com isto verificar se a virulência a um determinado par ocorre em frequência acima ou abaixo da esperada e se esta associação ocorre apenas por acaso. Uma associação positiva de virulência ocorre se os valores observados excedem significativamente os valores esperados nas categorias VaVb e AaAb. Se os valores observados nas categorias VaAb e AaVb são maiores que os esperados, a associação de virulência é negativa (Alexander & Roelfs, 1984; Vanderplank, 1984).

A ocorrência de associações de patogenicidade foi também analisada conforme Browder & Eversmeyer (1977). Para cada par de genótipos *a* e *b*, calculou-se um coeficiente de associação de patogenicidade (CAP) e um coeficiente de associação de virulência (CAV) como segue:

$$CAP = \frac{N^{\circ} \text{ de isolados AaAb} + N^{\circ} \text{ de isolados VaVb}}{N^{\circ} \text{ total de isolados}}$$

$$CAV = \frac{N^{\circ} \text{ de isolados VaVb}}{N^{\circ} \text{ total de isolados}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças nas frequências de virulência aos genótipos estudados foram observadas de um local para outro, sendo

TABELA 2 - Número esperado e observado de isolados de *Colletotrichum graminicola* com virulência a 19 pares de cultivares de sorgo em Sete Lagoas (MG) e Pelotas (RS).

Par de Cultivares	Sete Lagoas			Pelotas		
	E ^a	O	χ ² b	E	O	χ ²
CMSXS 112 X CMSXS 212	22,0	24,0	1,25	35,6	43,0	11,36**
CMSXS 211 X CMSXS 212	64,6	63,0	1,10	71,1	77,0	12,60**
CMSXS 211 X CMSXS180	61,2	64,0	5,63	50,1	57,0	14,89**
CMSXS 211 X CMSXS181	57,8	59,0	1,06	52,0	60,0	13,62**
CMSXS 212 X CMSXS179	55,5	61,0	7,73*	55,2	58,0	1,78
CMSXS 212 X CMSXS180	54,7	57,0	0,88	51,5	59,0	11,61**
CMSXS 116 X CMSXS178	14,4	21,0	9,19*	2,4	2,0	0,12
CMSXS 116 X CMSXS179	28,5	34,0	7,34*	15,6	21,0	6,24*
CMSXS 116 X CMSXS180	28,1	33,0	7,87*	14,5	20,0	6,92*
CMSXS 116 X CMSXS181	26,5	33,0	11,20**	15,0	22,0	10,25**
CMSXS 116 X CMSXS182	15,6	22,0	6,29*	6,1	18,0	38,9**
CMSXS 173 X CMSXS178	14,1	27,0	30,28**	0,9	4,0	10,99**
CMSXS 173 X CMSXS180	27,4	33,0	8,58*	5,3	9,0	5,89
CMSXS 178 X CMSXS179	27,0	33,0	8,88*	6,4	9,0	2,73
CMSXS 179 X CMSXS181	49,6	54,0	5,07	40,3	49,0	10,91**
CMSXS 179 X CMSXS182	29,2	36,0	11,60**	16,3	21,0	3,89
CMSXS 180 X CMSXS181	49,0	57,0	63,20**	37,6	50,0	21,73**
CMSXS 180 X CMSXS182	28,8	35,0	8,54*	15,2	22,0	8,08*
CMSXS 181 X CMSXS182	27,2	37,0	20,71**	15,7	21,0	4,95

^a E= Número esperado

O= Número observado

^b Associação significativamente positiva * (P<0,05) ou ** (P<0,01)

que, em relação a nove linhagens, estas frequências foram maiores em Sete Lagoas do que em Pelotas (Tabela 1). Tais diferenças resultam, provavelmente, de uma maior diversidade na população de *C. graminicola* em Sete Lagoas, devido a uma maior diversidade genética do hospedeiro dentro da área experimental do CNPMS, a qual exerce uma pressão de seleção contra o patógeno, dando origem a raças de maior complexidade.

Para a análise de virulência foram geradas, por local, 78 tabelas de contingências, das quais 36 e 29, respectivamente em Sete Lagoas e Pelotas, permitiram a análise pelo teste χ², por apresentarem frequência esperada superior a 5 em todas as células (Ott, 1984). Associações positivas de virulência foram observadas em relação a 19 pares de cultivares, algumas das quais foram altamente significativas nos dois locais. Por outro lado não foi observada a ocorrência de associações negativas de virulência entre as 78 combinações analisadas (Tabela 2).

Das 78 combinações de genótipos analisadas, 21 caracterizaram-se por apresentarem alto CAP e baixo CAV nos dois locais (Tabela 3). Tais combinações são potencialmente efetivas na obtenção de resistência durável a *C. graminicola*. Entretanto, altos CAP e baixos CAV em relação às combinações com o genótipo CMSXS 210 foram determinados principalmente pela ausência da virulência a este genótipo nos dois locais.

TABELA 3 - Coeficiente de associação de patogenicidade (CAP) e coeficiente de associação de virulência (CAV) de *Colletotrichum graminicola* a 21 pares de cultivares de sorgo, estimados em amostras coletadas em Sete Lagoas (MG) e Pelotas (RS).

Par de Cultivares	Sete Lagoas		Pelotas	
	CAP	CAV	CAP	CAV
CMSXS 112 X CMSXS 210	0,71	0,00	0,63	0,02
CMSXS 112 X CMSXS 169	0,62	0,02	0,65	0,05
CMSXS 112 X CMSXS 173	0,56	0,12	0,63	0,05
CMSXS 112 X CMSXS 178	0,55	0,11	0,57	0,02
CMSXS 210 X CMSXS 211	0,15	0,00	0,26	0,02
CMSXS 210 X CMSXS 212	0,24	0,00	0,24	0,02
CMSXS 210 X CMSXS 116	0,61	0,00	0,75	0,00
CMSXS 210 X CMSXS 169	0,87	0,00	0,92	0,00
CMSXS 210 X CMSXS 173	0,62	0,00	0,90	0,00
CMSXS 210 X CMSXS 178	0,63	0,00	0,89	0,00
CMSXS 210 X CMSXS 179	0,27	0,00	0,42	0,00
CMSXS 210 X CMSXS 180	0,28	0,00	0,45	0,01
CMSXS 210 X CMSXS 181	0,32	0,00	0,45	0,02
CMSXS 210 X CMSXS 182	0,60	0,00	0,75	0,00
CMSXS 211 X CMSXS 169	0,23	0,00	0,29	0,06
CMSXS 212 X CMSXS 169	0,32	0,10	0,29	0,07
CMSXS 116 X CMSXS 169	0,64	0,08	0,82	0,05
CMSXS 169 X CMSXS 173	0,62	0,06	0,93	0,04
CMSXS 169 X CMSXS 178	0,67	0,08	0,84	0,00
CMSXS 169 X CMSXS 181	0,38	0,09	0,48	0,06
CMSXS 169 X CMSXS 182	0,57	0,06	0,82	0,06

Amostragens envolvendo a mistura de diferentes populações de um determinado patógeno podem levar a falsas conclusões sobre a ocorrência de associações de patogenicidade (Alexander *et al.*, 1984; Wolfe & Knott, 1982). No presente trabalho os dados foram obtidos de duas populações geograficamente distantes e tratados separadamente, o que permitiu a detecção de diferenças entre locais quanto a associações de virulência a determinados genótipos, demonstrando-se a importância da observação feita pelos citados autores.

A efetividade da resistência genética a *C. graminicola* em cultivares de sorgo tem sido muitas vezes perdida devido ao desenvolvimento da virulência na população do patógeno (Casela & Ferreira, 1987; Casela & Frederiksen, 1994). Uma possível estratégia para se aumentar a durabilidade da resistência seria a produção de híbridos em cujos progenitores a virulência se encontre dissociada na população. Nas duas populações analisadas, entretanto, não se verificou a ocorrência de dissociação de virulência em relação aos genótipos de sorgo analisados. Contrariamente, para certos genótipos, a virulência mostrou-se altamente associada. Estes resultados confirmam observações anteriores feitas por Casela &

Ferreira (1995) em relação à estrutura de virulência deste patógeno.

Associações positivas de virulência refletem uma alta adaptabilidade do patógeno (Lebeda, 1981; Alexander *et al.*, 1984), indicando uma baixa efetividade dos correspondentes fatores de resistência do hospedeiro. De acordo com Brown *et al.* (1993), a adaptação do patógeno à resistência do hospedeiro pode resultar da rápida multiplicação de um único indivíduo com os fatores de virulência correspondentes ou de uma série de indivíduos geneticamente distintos tendo em comum os referidos genes de virulência. A alta variabilidade apresentada por *C. graminicola*, quando isolados monospóricos deste patógeno foram analisados por marcadores do tipo RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Casela, 1992) sugere que a segunda possibilidade seja a explicação mais provável para a adaptabilidade deste patógeno às condições brasileiras.

A ocorrência de associações positivas de virulência é também indicativa de que, no caso de *C. graminicola*, o acúmulo de virulência não resulta necessariamente em uma perda de agressividade, conforme proposto por Vanderplank (1984). Contudo em patógenos de reprodução predominantemente assexuada, como no caso de *C. graminicola*, os efeitos deletérios resultantes da virulência desnecessária podem ser anulados pela ação da seleção em indivíduos sobre combinações favoráveis de genes para sobrevivência (Leonard, 1977). É possível que a diversidade genética na população do hospedeiro tenha permitido o desenvolvimento de uma maior diversidade na população do patógeno e, conseqüentemente, de raças de alta virulência. Como resultado há uma redução na ação da seleção estabilizadora contra a virulência desnecessária.

A ocorrência de altos valores de CAP e baixos de CAV, observada em relação a certos pares de genótipos, confirmam observações anteriores de Casela & Ferreira (1995). Situações semelhantes foram observadas por Browder & Eversmeyer (1977) em *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e por Lebeda (1981) em relação ao patógeno *Erysiphe graminis*. Entretanto, grandes diferenças entre CAP e CAV podem ocorrer devido a uma baixa freqüência de patogenicidade a determinados genes de resistência, sem a ocorrência de seleção estabilizadora contra estas associações de virulência na população (Wolfe & Knott, 1982). Essa situação ocorreu, com freqüência, no trabalho conduzido por Lebeda (1981) em relação às combinações potencialmente duráveis de genes de resistência para o controle de *E. graminis*. As associações de genes correspondentes de virulência apresentaram freqüências observadas significativamente superiores às freqüências esperadas, com possibilidade, portanto, de serem rapidamente superadas pelo patógeno. Essa situação não ocorreu no presente trabalho, o que permite supor que as combinações de alto CAP e baixo CAV, aqui observadas, poderão apresentar uma resistência de maior durabilidade a *C. graminicola*.

Não foram identificadas combinações de genótipos potencialmente efetivas para o controle de *C. graminicola* através da análise da estrutura de virulência das populações. As associações de virulência ocorreram inteiramente ao acaso ou em freqüências significativamente superiores às que-las esperadas. Entretanto, a análise de associações de patoge-

nicidade permitiu a detecção de combinações de genótipos para as quais a associação de virulência na população do patógeno é ainda baixa. Algumas destas combinações correspondem a híbridos experimentais em fase de lançamento pelo CNPMS. O acompanhamento destes híbridos, nos anos subsequentes ao seu lançamento, permitirá se avaliar a eficiência deste método de análise como um instrumento auxiliar no programa de melhoramento para resistência a este patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, H.M.; ROELFS, A.P. & GROTH, J.P. Pathogenicity associations in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in the United States. *Phytopathology* 74:1161-1168. 1984.
- BROWDER, L.E. & EVERSMEYER, M.G. Pathogenicity associations in *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathology* 67:766-771. 1977.
- BROWN, D.K.M.; SIMPSON, C.E. & WOLFE, M.S. Adaptation of barley powdery mildew populations in England to varieties with two resistance genes. *Plant Pathology* 42:108-115. 1993.
- CASELA, C.R. Investigations on the variability of the sorghum anthracnose fungus *Collectotrichum graminicola*. Ph.D. Dissertation. Texas A & M University. 1992. 166pp.
- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. Proposta para um sistema de classificação de raças de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). *Fitopatol. bras.* 12:337-344. 1987.
- CASELA, C.R. & FREDERIKSEN, R.A. Pathogenic variation in monoconidial cultures of *Colletotrichum graminicola* from a single lesion and from monoconidial subcultures. *Fitopatol. bras.* 149-153. 1994.
- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. Associações de virulência em *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo. *Fitopatol. bras.* 20:33-38. 1995.
- FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. Raças patogênicas de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Fitopatol. bras.* 11:83-97. 1986.
- GROTH, J.V. & ROELFS, A.P. Analysis of virulence diversity in populations of plant pathogens. In: M.S. Wolfe & C.E. Caten, eds. *Populations of Plant Pathogens. Their Dynamics and Genetics*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 63-74. 1987.
- LEBEDA, A. Population genetics of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Phytopathology* 71: 228-239. 1981.
- LEONARD, K.J. Selection pressure and plant pathogens: genetic basis of epidemics in agriculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 287:202-222. 1977.
- NAKAMURA, K. Especialização fisiológica em *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu Arx). Tese de Livre Docência. Jaboticabal. FCAVJ. 1987. 147pp.
- OTT, L. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Plus Kent Publishing Company. Boston. 1988. 885 pp.
- VANDERPLANK, J.E. Host-Pathogen Interaction in Plant Diseases. Academic Press. New York. 1982. 207 pp.
- VANDERPLANK, J.E. Disease Resistance in Plants. Academic Press. New York. 1984. 194 pp.
- WOLFE, M.S. & KNOTT, D.R. Populations of plant pathogens: some constraints on analysis of the variation in pathogenicity. *Plant Pathology* 31: 79-90. 1982.