

# ASSOCIAÇÃO DE VIRULÊNCIA DE *Colletotrichum graminicola* À RESISTÊNCIA GENÉTICA EM SORGO

CARLOS R. CASELA, ALEXANDRE S. FERREIRA & FREDOLINO G. SANTOS

Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, fax: (031) 779-1088, e-mail: casela@cnpms.embrapa.br

(Aceito para publicação em 24/04/98)

Autor para correspondência: Carlos R. Casela

CASELA, C.R., FERREIRA, A.S. & SANTOS, F.G. Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. Fitopatologia Brasileira 23:143-146. 1998.

## RESUMO

Foi analisada a estrutura de virulência de *Colletotrichum graminicola* em populações do patógeno amostradas em três áreas de ocorrência da doença. Foram determinadas as frequências esperada e observada de virulência associada a todas as combinações de linhagens duas a duas em uma série diferencial formada por 10 genótipos de sorgo (cinco linhagens A e cinco linhagens R). As populações do patógeno foram também avaliadas através de um coeficiente de

associação de patogenicidade e de um coeficiente de associação de virulência para cada combinação de linhagens. Foram identificadas 15 combinações de linhagens para as quais a virulência não se encontrava associada na população. Tais combinações são fontes para a obtenção de resistência durável a *C. graminicola*.

Palavras-chave: antracnose, patogenicidade, resistência durável.

## ABSTRACT

### Virulence association with genetic resistance in the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*

The virulence structure of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* was analyzed in populations of the fungus sampled at three locations. Virulence associations with combinations of two lines in a set of ten sorghum genotypes (five A lines and five R lines), were calculated. Virulence associations were also analyzed using

a pathogenicity association coefficient and a virulence association coefficient. Fifteen combinations with which virulence was not associated in the population were identified and represent potential sources for the development of durable resistance to *C. graminicola*.

## INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces. Wils.), é uma importante doença a afetar economicamente a cultura do sorgo no Brasil. A doença representa, na maioria das vezes, um sério problema em regiões mais quentes e úmidas, embora perdas severas possam também ocorrer em áreas sujeitas a breves períodos de chuva seguidos de seca prolongada (Frederiksen *et al.*, 1995).

No Brasil, a antracnose está presente em todas as regiões de plantio de sorgo, podendo causar perdas significativas à produção. A estratégia mais eficiente para o controle desta doença é a utilização de cultivares resistentes. O uso da resistência genética é, entretanto, dificultada pela ocorrência de variabilidade na população de *C. graminicola* conforme documentado em vários trabalhos realizados tanto no Brasil, quanto em outros países onde a doença está presente (Casela

*et al.*, 1996; Cardwell *et al.*, 1987; Cardwell *et al.*, 1989; Pande *et al.*, 1991). Tal fato determinou a busca de alternativas que permitissem a obtenção de cultivares de sorgo com resistência de maior durabilidade a este patógeno. Uma alternativa tem sido a identificação e seleção de genótipos com resistência dilatária, expressa pela maior capacidade de se retardar o desenvolvimento da doença no campo (Guimarães, 1996). Uma outra alternativa tem sido a identificação de combinações de genótipos de sorgo para os quais a virulência não esteja associada na população do patógeno. Esta identificação é realizada através da análise da estrutura de virulência (Vanderplank, 1984; Alexander *et al.*, 1984) e pela identificação de associações de patogenicidade e de virulência no patógeno (Browder & Eversmeyer, 1977; Lebeda, 1981). A análise da estrutura de virulência tem sido uma alternativa à classificação dos isolados de um determinado patógeno em raças fisiológicas de acordo com a reação apresentada por uma série diferencial padrão. Neste procedimento procura-se

identificar situações em que a associação, em um genótipo do hospedeiro, de dois ou mais genes de resistência imponha limitações à capacidade adaptativa do patógeno dificultando a associação, em um único indivíduo, dos fatores de virulência correspondentes. Linhagens A (macho-estéreis) e R (restauradoras) podem ser cruzadas para a formação de híbridos com resistência de alta durabilidade se a combinação dos genes de virulência correspondentes for rara na população do patógeno. Foram já identificadas 21 combinações de linhagens de sorgo com baixos níveis de associações de virulência em *C. graminicola* (Casela *et al.*, 1996).

Este trabalho teve por objetivo obter informações sobre a variabilidade e estrutura de virulência de *C. graminicola* e identificar combinações de genótipos de sorgo potencialmente efetivas para a obtenção de resistência durável a este patógeno, a partir de amostras de isolados obtidas de 3 áreas de ocorrência da doença.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados de *C. graminicola* foram obtidos a partir de amostragens realizadas em Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS) e Jataí (GO), em plantas de populações hospedeiras formadas por uma mistura, em partes iguais, de linhagens elites do programa de melhoramento de sorgo da EMBRAPA Milho e Sorgo. Esta mistura foi semeada em áreas de aproximadamente 1000m<sup>2</sup> nos 3 locais acima citados.

Para a obtenção dos isolados, cada área foi subdividida em 10 parcelas de 100m<sup>2</sup>, de onde foram coletados, ao acaso, folhas de 5 a 6 plantas infectadas. Espécimens coletadas foram desinfestadas superficialmente por dois minutos em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e plaqueadas em meio de farinha de aveia - ágar (FAA). As placas foram em seguida 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 uma raspagem superficial do meio com o auxílio de uma espátula. A suspensão obtida foi diluída em série até a concentração de 100 conídios/ml. Foi feita, em seguida, a transferência de 1ml desta suspensão para uma placa de Petri contendo ágar - água a 2%, a qual foi incubada por um período de 12 horas, nas condições acima descritas para a indução de germinação. Após este período foram obtidos os isolados monospóricos na proporção de um para cada planta amostrada, num total de 50 isolados por local.

Os isolados foram testados em uma série diferencial formada por 5 linhagens macho-estéreis (A) e 5 linhagens restauradoras (R). Estas linhagens foram também as componentes da mistura utilizada para a coleta dos isolados de *C. graminicola*. As inoculações foram realizadas em casa de vegetação, em plantas aos 28 dias após a semeadura, utilizando-se uma concentração de inóculo de 10<sup>6</sup> conídios/ml, com um pulverizador manual Uni-spray Mod. 2000. Foram inoculados aproximadamente 10ml de suspensão por vaso com 5 plantas. Após a inoculação as plantas foram colocadas em câmara úmida por 18 horas, sendo em seguida transferidas para mesas, onde permaneceram até a época de avaliação, a uma temperatura de 25 - 30 °C. O delineamento expe-

rimental utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas em 3 repetições com os isolados nas parcelas e cultivares nas subparcelas. Cada vaso com 5 plantas de uma mesma cultivar constituiu uma subparcela.

A avaliação foi realizada aos 12 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas com valores de 1 a 5 conforme Cardwell *et al.* (1989), como descrito a seguir:

1. presença de pequenas pontuações necróticas;
2. presença de pequenas manchas avermelhadas sem a presença de acérvulos;
3. lesões necróticas, mas sem a presença de acérvulos;
4. lesões necróticas com a presença de acérvulos no centro;
5. lesões necróticas, coalescidas e com abundante produção de acérvulos.

Foram consideradas duas classes de reações: resistente (incluindo as notas 1, 2 e 3) e suscetível (incluindo as notas 4 e 5).

A diversidade populacional de *C. graminicola*, nos três locais de amostragem, foi comparada através do índice de Gleason (Groth & Roelfs, 1987) que reflete diferenças na diversidade entre populações levando em consideração o número de raças identificadas e o tamanho das amostras. Este índice é calculado pela fórmula:

$$Ht = (r - 1) / \ln(N)$$

Onde r = o número de fenótipos distintos identificados e N = o número de isolados na amostra.

Para se detectar a ocorrência de associações de virulência em relação a duas linhagens quaisquer *a* e *b* da série diferencial, os isolados foram separados em cada uma das quatro possíveis categorias de virulência ou avirulência a estas duas linhagens: VaVb: isolado virulento às linhagens *a* e *b*; VaAb: isolado virulento à linhagem *a* e avirulento à linhagem *b*; AaVb: isolado avirulento à linhagem *a* e virulento à linhagem *b*; AaAb: isolado avirulento à linhagem *a* e avirulento à linhagem *b*. Para a análise dos dados calculou-se a frequência de virulência, ou seja, a proporção de isolados, em cada população amostrada, com virulência a cada linhagem individualmente. Com base nestes dados calculou-se as frequências esperada e observada, de cada uma das quatro categorias de virulência e de avirulência acima descritas (Alexander *et al.*, 1984).

As frequências esperada e observada foram comparadas através do teste de X<sup>2</sup>. Uma associação positiva de virulência ocorre quando os valores observados significativamente excedem os esperados nas categorias VaVb e AaAb e uma associação negativa ocorre quando os valores observados são significativamente inferiores aos esperados nas mesmas categorias (Alexander *et al.*, 1984; Vanderplank, 1984).

As associações de patogenicidade foram também analisadas conforme Browder & Eversmeyer (1977). Para cada combinação de linhagens quaisquer *a* e *b* da série diferencial foi calculado um coeficiente de associação de patogenicidade (CAP) e um coeficiente de associação de virulência (CAV) como segue:

$$CAP = \frac{N^\circ \text{ de Isolados AaAb} + N^\circ \text{ de Isolados VaVb}}{N^\circ \text{ Total de Isolados}}$$

$$CAV = \frac{N^\circ \text{ de Isolados VaVb}}{N^\circ \text{ Total de Isolados}}$$

Valores de CAP e de CAV, muito próximos entre si, indicam uma alta proporção de isolados na população com virulência associada às duas linhagens. Por outro lado um alto CAP e um baixo CAV, indicam que a maioria dos isolados na população não possui virulência associada às duas linhagens. Cruzamentos entre estas duas linhagens poderá resultar em híbridos ou linhagens com resistência de alta durabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências de virulência obtidas foram semelhantes entre si nos três locais amostrados. Observou-se, entretanto, uma maior proporção de isolados com virulência à linhagem CMS216 em Pelotas e Jataí em relação a Sete Lagoas (Tabela 1). Uma maior diversidade fenotípica foi observada em Sete Lagoas como demonstrado pelos valores do índice de diversidade de Gleason que foram de 6,39 para Sete Lagoas; 5,34 para Pelotas e de 4,20 para Jataí. A maior diversidade observada na população amostrada em Sete Lagoas reflete, provavelmente, uma resposta do patógeno à uma maior diversidade na população do hospedeiro, dentro da área experimental da EMBRAPA Milho e Sorgo.

**TABELA 1 - Frequência de virulência de *Colletotrichum graminicola* a 10 linhagens de sorgo em amostras coletadas em Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS) e Jataí (GO), em 1995.**

Cultivar	Frequência de Virulência/Local		
	Sete Lagoas	Pelotas	Jataí
BR009A	1,00	0,97	1,00
CMS210A	0,00	0,03	0,00
CMS215A	0,12	0,08	0,00
CMS216A	0,70	0,97	0,97
CMS217A	0,40	0,48	0,39
CMS178R	0,20	0,37	0,35
CMS179R	0,60	0,71	0,52
CMS180R	0,38	0,40	0,42
CMS181R	0,38	0,48	0,32
CMS182R	0,22	0,28	0,26

Considerando-se as combinações entre linhagens macho-estéreis (A) e férteis (R), observou-se a ocorrência de associações positivas de virulência em relação às combinações CMS217A - CMS181R em Pelotas e Sete Lagoas e CMS217A - CMS179R e CMS217A - CMS182R, em Sete Lagoas e Jataí. Cruzamentos entre estas linhagens não gerariam, provavelmente, híbridos de sorgo com uma resistência de alta durabilidade, já que virulência a estes genótipos já se encontra altamente associada na população. A virulência esteve também positivamente associada em relação a combinações entre as linhagens CMS178R, CMS179R, CMS180R, CMS181R e CMS182R. Estas associações podem ser explicadas por estas linhagens terem em comum o progenitor BR005R nos cruzamentos que lhes deram origem, o que indica a possibilidade de terem genes de resistência em comum. Poucas associações negativas de virulência foram observadas nas 3 populações. Este poucos casos foram, en-

tretanto, inconsistentes entre locais e em relação a observações de anos anteriores não servindo como indicação para a obtenção de resistência durável.

Associações positivas de virulência têm sido observadas com frequência na população de *C. graminicola* e refletem uma alta capacidade adaptativa deste patógeno conforme discutido por Lebeda (1981) e Alexander *et al.* (1984) para outros patossistemas. Tal fato impõe limites ao uso da resistência vertical para o manejo deste patógeno. De fato a formação de pirâmides de genes de resistência vertical a *C. graminicola* tem sido, em certos casos, de pouca eficiência no manejo desta doença devido à sua pouca durabilidade (Cardwell *et al.*, 1987). Associações positivas de virulência podem ser também determinadas pela ausência de recombinação genética em patógenos de reprodução assexuada, como em *C. graminicola*. Nesta situação, um fator de virulência desnecessário pode ter a sua proporção aumentada na população por estar ligado a outro gene de virulência sob pressão de seleção ou por estar associado a outros genes responsáveis pela maior agressividade. A seleção, neste caso, não estaria atuando diretamente sobre os genes desnecessários de virulência, mas sim sobre outros genes a eles associados (Alexander *et al.*, 1984; Brown & Wolfe, 1990; Brown, 1995).

Apesar da alta diversidade observada em *C. graminicola* existem limites à capacidade de adaptação do patógeno à resistência genética do hospedeiro. A alta resistência da linhagem CMS210A a este patógeno vem se mantendo estável ao longo dos últimos anos. Situação semelhante se observa em relação à linhagem BR005R, cuja resistência tem sido amplamente utilizada no programa de melhoramento de sorgo desde 1975 (não publicado). Conforme observado pelos autores raças com virulência associada a esta linhagem e à linhagem BR008A não têm sido detectadas ou têm ocorrido em baixa proporção ao longo dos últimos anos, o que indica uma perda em agressividade quando o patógeno associa, em um único indivíduo, virulência a estas duas linhagens.

A seleção de combinações de linhagens de sorgo, através dos coeficientes de associação de patogenicidade e de virulência, oferece uma alternativa como estratégia para a obtenção de resistência durável a *C. graminicola*. Quinze combinações de linhagens com altos valores de CAP e baixos valores de CAV foram identificadas nos três locais amostrados. Estas combinações envolveram as linhagens macho-estéreis CMS210A e CMS215A (Tabela 2). Os resultados obtidos com a linhagem CMS210A, confirmam observações anteriores a respeito do potencial deste genótipo como fonte de resistência durável a *C. graminicola* (Casela *et al.*, 1996). As combinações com as linhagem CMS215A também apresentaram-se promissoras como fontes de resistência a *C. graminicola*, quando em combinação com linhagens restauradoras. A combinação, em um mesmo genótipo, de dois ou mais genes de resistência para os quais a virulência não se acha associada na população, determina uma resistência mais difícil de ser superada pelo patógeno. Quanto maior a desvantagem para o patógeno antes da introdução de determinada resistência, menor a frequência dos fatores de virulência correspondentes, o que determina um atraso no seu estabelecimento na população (Gale, 1987).

**TABELA 2 - Coeficientes de associação de patogenicidade (CAP) e de virulência (CAV) de *Colletotrichum graminicola* a 15 combinações de linhagens elites de sorgo, estimados em 3 populações do patógeno amostradas em Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS) e Jataí (GO), em 1995.**

Linhagens	Sete Lagoas		Pelotas		Jataí	
	CAP	CAV	CAP	CAV	CAP	CAV
CMS210A x CMS215A	0,88	0,00	0,94	0,03	1,00	0,00
CMS210A x CMS216A	0,30	0,00	0,30	0,00	0,30	0,00
CMS210A x CMS217A	0,60	0,00	0,48	0,00	0,52	0,00
CMS210A x CMS178R	0,80	0,00	0,60	0,00	0,55	0,00
CMS210A x CMS179R	0,40	0,00	0,31	0,03	0,30	0,00
CMS210A x CMS180R	0,62	0,00	0,57	0,00	0,48	0,00
CMS210A x CMS181R	0,62	0,00	0,45	0,00	0,58	0,00
CMS210A x CMS182R	0,78	0,00	0,69	0,00	0,64	0,00
CMS215A x CMS216A	0,42	0,12	0,11	0,09	0,03	0,00
CMS215A x CMS217A	0,60	0,10	0,43	0,00	0,52	0,00
CMS215A x CMS178R	0,80	0,06	0,66	0,06	0,55	0,00
CMS215A x CMS179R	0,43	0,00	0,23	0,03	0,39	0,00
CMS215A x CMS180R	0,61	0,08	0,49	0,00	0,48	0,00
CMS215A x CMS181R	0,54	0,06	0,40	0,00	0,58	0,00
CMS215A x CMS182R	0,78	0,06	0,63	0,00	0,64	0,00

O híbrido experimental CMS376, em fase de lançamento, é resultado do cruzamento entre as linhagens CMS210A e CMS178R, para as foram encontrados altos valores de CAP e baixos de CAV nos 3 locais amostrados. A alta resistência apresentada por este híbrido em observações de campo em diferentes locais (Santos, comunicação pessoal) confirmam as previsões feitas com base nos resultados do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, H. M., ROELS, A. P. & GROTH, J. P. Pathogenic 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, J. K. M. & WOLFE, M. S. Structure and evolution of a population of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Pathology* 39: 376-390. 1990.
- BROWN, J. K. M. Recombination and selection in population of plant pathogens. *Plant Pathology* 44: 279-293. 1995.
- CASELA, C. R., FERREIRA, A. S. & BRANÇÃO, N. Variabilidade e estrutura de virulência em *Colletotrichum graminicola* em sorgo. *Fitopatologia Brasileira* 21: 357-361. 1996.
- CARDWELL, K. F., KIRKPATRICK, T. L., DALE, J. L. & HOLLIER, C. A. Reported regional outbreaks of anthracnose of sorghum in a tristate area in 1985-86. *Sorghum Newsletter* 30: 89-90. 1987.
- CARDWELL, K. F., HEPPELY, P.R. & FREDERIKSEN, R. A. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease* 73: 255-257. 1989.
- FREDERIKSEN, R. A., THOMAS, M. D., BANDYOPADHYAY, R. & MUGHOGHO, L. Variable pathogens of sorghum. In: Leslie, J. F. & Frederiksen, R. A., eds. *Disease Analysis through Genetics and Biotechnology. Interdisciplinary Bridges to Improved Sorghum and Millet Crops*. Iowa State University Press. Ames. Pp. 11-23. 1995.
- GALE, J. S. Factors delaying the spread of a virulent mutant of a fungal pathogen: some suggestions from population genetics. In: Wolfe, M. S. & Caten, C. E., eds. *Populations of Plant Pathogens: their Dynamics and Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 55-62.
- GROTH, J. V. & ROELFS, A. P. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology* 77: 1395-1399. 1987.
- GUIMARÃES, F. B. Resistência dilatária à antracnose (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench. (Tese de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- LEBEDA, A. Population genetics of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Phytopathol. Z.* 71: 228-239. 1981.
- PANDE, S., MUGHOGHO, L. K., BANDYOPADHYAY, R. & KARUNAKAR, R. I. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease* 75: 778-783. 1991.
- VANDERPLANK, J. E. *Disease Resistance in Plants*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Academic Press. 1984.