

elucidação de mecanismos que geram variabilidade em *C. lindemuthianum* permitirá o conhecimento genético deste patógeno que ocasiona perdas consideráveis nos climas tropicais, bem como, estabelecer a estrutura e a dinâmica populacional do mesmo, gerando informações importantes para os programas de melhoramento visando resistência a antracnose do feijoeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo JL (1998) Genética de Microrganismo. Goiania GO. Universidade Federal de Goias.
- Barcelos Q, Souza EA (2008) Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. Annual Report Bean Improvement Cooperative 51:176-177.
- Camargo Junior OA, Souza EA, Mendes-Costa MC, Santos JB, Soares MA (2007) Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD. Genetics and Molecular Biology 6:607-615.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (1990) Programa de frijol: Informe Anual de 1998. Cali, p. 128-129. CIAT-Documento de trabajo, 72.
- Hastie AC (1981) The genetics of conidial fungi. In: Cole GT & Kendrick B (Eds.) Biology of conidial fungi. New York NY. Academic Press. Vol 2, pp. 511-547.
- Ishikawa FH, Souza EA (2004) Caracterização dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* (fase assexual) e *Glomerella cingulata* (fase sexual), agente causal da antracnose de feijoeiro. In: Resumos XVII Congresso de Iniciação Científica da UFLA - CICESAL. Lavras MG. CD-ROM.
- Ishikawa FH, Souza EA, Davide LC, Santos JB (2008) Genetic and pathogenic variability within race 65 of causal agent of common bean anthracnose. Bean Improvement Cooperative. East Lansing MI. Michigan State University. Annual Report no. 51. pp. 186-187.
- Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (1997) Manual de Fitopatologia, Vol. II - Doenças da Plantas Cultivadas. 3ª Edição. São Paulo SP. Editora Agronômica Ceres.
- Kimati H, Galli F (1970) *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & v. Schrenk. f. sp. *phaseoli* n.f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. Piracicaba SP. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 27:411-437.
- O'Sullivan D, Tosi P, Creusot F, Cooke BM, Phan TH, Dron M, Langin T (1998) Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Current Genetics 33:291-298.
- Pastor-Corrales MA (2007) An integrated approach for the management of *Colletotrichum* diseases of common bean with emphasis on effective fungicide management. Fitopatologia Brasileira 32(Supl):27-29.
- Roca MG, Davide LC, Mendes-Costa MC, Wheals A (2003) Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. Fungal Genetics and Biology 40:138-145.
- Rodriguez-Guerra R, Ramirez-Rueda MT, Martinez O, Sompson J (2003) Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. Plant Pathology 52:228-235.
- Rodriguez-Guerra R, Ramirez-Rueda MT, Cabral-Enciso M, Garcia-Serrano M, Lira-Maldonado Z, Guevara-González RG, Gonzalez-Chavira M, Simpson J (2005) Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. Mycologia 97:793-803.
- Silva KJD, Souza EA, Ishikawa FH (2007) Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. Journal of Phytopathology 155:241-247.
- Tu J (1992) *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: population dynamics of pathogen and breeding for resistance. In: Bailey JA, Jeger MJ (Eds.) *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford UK. CAB International. pp. 203-224.
- Vaillancourt LJ, Hanau RM (1999) Sexuality of self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. Mycologia 91:593-596.

Variabilidade patogênica e resistência genética no patossistema milho - *Colletotrichum graminicola*

Rodrigo Veras. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: veras@cpnms.embrapa.br

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson, é considerada uma das principais doenças da cultura do milho no Brasil. Esse patógeno é capaz de atacar todas as partes da planta, embora, as fases de antracnose foliar e de podridão de colmo sejam consideradas as mais importantes. Os plantios sucessivos e a ampla adoção do sistema de plantio direto, sem rotação de

culturas, têm favorecido a ocorrência de severas epidemias desta doença devido ao rápido acúmulo de inóculo na área de cultivo. A resistência genética é considerada a principal estratégia de manejo dessa enfermidade. Entretanto, a utilização dessa medida de controle pode ser dificultada pela variabilidade patogênica apresentada por *C. graminicola*, resultando na rápida adaptação do patógeno aos materiais

resistentes disponível no mercado (Ferreira & Casela, 2001). Portanto, um maior conhecimento da variabilidade e estrutura populacional deste patógeno é fundamental para o estabelecimento de estratégias de manejo que possibilitem a obtenção de níveis mais estáveis de resistência nesse patossistema.

Isolados de *C. graminicola* apresentam elevada variabilidade patogênica tanto em folhas como em colmo de milho. Entretanto, existem controvérsias quanto à existência de raças fisiológicas desse patógeno. Forgey *et al.* (1978) identificou oito raças de *C. graminicola* com base na reação de 10 linhagens de milho a 10 isolados do patógeno. No entanto, Nicholson & Warren (1981) utilizando as mesmas linhagens e sete dos dez isolados utilizados por Forgey *et al.* (1978) concluíram que os isolados diferiram quanto a agressividade às linhagens utilizadas e não à virulência, e que os dados não eram suficientes para caracterização de raças fisiológicas. Esses resultados foram confirmados em estudos posteriores (Barbosa, 2001; Coelho *et al.*, 2001; White *et al.*, 1987).

Marcadores moleculares RAPD têm sido utilizados para identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* em diversos patossistemas devido à vantagem de serem mais rápidos e de custo mais baixo (Sicard *et al.*, 1997). Barbosa (2001) comparou isolados de *C. graminicola* de milho com auxílio de marcadores RAPD e de virulência em casa de vegetação, e verificou a existência de elevada variabilidade patogênica, embora sem evidência da existência de raças fisiológicas. Segundo o autor, os padrões de bandas, agrupamentos de similaridade e análise de virulência confirmaram resultados anteriores a respeito da variação em agressividade entre os isolados e ausência de interação diferencial com o hospedeiro.

Apesar desses resultados não suportarem a hipótese da existência de raças fisiológicas em populações de *C. graminicola* é bastante provável que elas ocorram na natureza, à semelhança do que acontece com outras espécies de *Colletotrichum*, como *C. sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo. Um ponto importante a ser observado é o pequeno número de isolados utilizados para caracterização de raças em todos os trabalhos mencionados anteriormente. Além disso, os critérios de avaliação são, também, extremamente importantes (Nicholson & Warren, 1981). Barbosa (2001) utilizou os parâmetros de tamanho e largura de lesão para caracterizar a reação de plantas de milho a diferentes isolados de *C. graminicola*, visando caracterização de raças fisiológicas. Entretanto, esses parâmetros estão mais relacionados ao tipo de resistência horizontal no hospedeiro e à agressividade nas populações do patógeno. Além disso, a presença de resistência horizontal em determinado genótipo não exclui a possibilidade da existência de resistência do tipo vertical (Silva, 1983). Segundo Barbosa (2001), a existência de várias fontes de resistência e, principalmente, resistência controlada por poligenes, dificulta o surgimento de raças de *C. graminicola* de milho. Entretanto, a resistência do tipo oligogênica com ação gênica dominante foi detectada

(Coelho *et al.*, 2001), o que indica a provável existência de uma relação gene-a-gene nesse patossistema.

No presente trabalho são relatados estudos sobre a variabilidade existente em populações de *C. graminicola* quanto à patogenicidade e parâmetros, na interação patógeno-hospedeiro, que possibilitem identificar o tipo predominante de resistência em plantas de milho à infecção foliar causada por *C. graminicola*. O trabalho será relatado em três etapas: 1) Variabilidade patogênica de isolados de *C. graminicola* em genótipos de milho em casa de vegetação; 2) Período latente e taxa de esporulação de isolados de *C. graminicola* em milho; 3) Avaliação de genótipos de milho quanto à severidade da antracnose foliar em condição de campo.

Etapa 1

Foi avaliada a reação de 15 genótipos de milho (híbridos e linhagens) quanto à reação a 190 isolados monospóricos de *C. graminicola* oriundos de diferentes regiões produtoras do Brasil. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em parcelas subdivididas, com os isolados nas parcelas e os genótipos de milho nas subparcelas. O inóculo foi aplicado em plantas com 21 dias de idade, utilizando-se um pulverizador manual. Após a inoculação, as plantas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 100% de umidade relativa e no escuro. Após esse período, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, a temperatura de 25-28°C, até o momento das avaliações. As avaliações do grau de resistência ou de suscetibilidade dos genótipos foram realizadas aos 15 dias após as inoculações. Foi utilizada uma escala de notas baseada nos critérios de tipo de lesão, presença de esporulação e severidade da doença.

Dentre os patótipos identificados, três representaram quase 90% dos isolados testados. O patótipo denominado 00.00 (virulento a todos os genótipos) representou cerca de 68% dos isolados testados. Os patótipos 00.32 e 00.16 (avirulentos apenas para os híbridos 2B710 e P 30F35, respectivamente) representaram aproximadamente 17 e 5% dos isolados inoculados. Os demais patótipos apresentaram baixa frequência de ocorrência. Os resultados obtidos indicaram a existência de resistência vertical em alguns genótipos de milho e de raças fisiológicas na população de *C. graminicola*. Entretanto, entre os híbridos BRS1001, BRS1010, BRS1030 e BRS1035, e suas respectivas linhagens, não foi identificada resistência vertical ao referido patógeno.

Considerando os casos em que a reação dos genótipos foi de suscetibilidade ao patógeno foram observadas diferenças com relação à severidade dos sintomas nos diferentes genótipos. Na linhagem L182, a qual apresentou predominantemente reação de suscetibilidade, foi verificada menor severidade da antracnose foliar quando comparada aos demais genótipos avaliados. Esses resultados indicam a existência conjunta de resistência vertical e horizontal no germoplasma de milho a essa enfermidade. Resultados semelhantes foram observados para a linhagem L 2283 e L 141.

Etapa 2

Com base nos resultados dos ensaios descritos anteriormente foram selecionados três isolados de *C. graminicola* que apresentaram maior espectro de virulência, ou seja, que foram virulentos a todos os genótipos testados. Esses isolados foram novamente inoculados nos 15 genótipos de milho, testados anteriormente, visando determinar o período latente (PL) e a taxa de esporulação (TE) para cada combinação isolado x genótipo.

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, em arranjo de parcela subdividida, com 45 tratamentos (3 isolados x 3 genótipos) e quatro repetições, totalizando 180 vasos. Os isolados foram dispostos nas parcelas e os híbridos nas subparcelas. O procedimento adotado para preparo do inóculo e inoculação foi o mesmo descrito anteriormente. Para determinação do PL, as plantas de milho foram avaliadas, quanto à presença de lesões esporulantes, em intervalo de 24 horas, após o segundo dia das inoculações. Foram avaliadas todas as folhas inoculadas em três plantas por vasos. Para determinação da taxa de esporulação fragmentos de folhas contendo lesões foram recortados, as lesões medidas e os esporos removidos e quantificados em hemacitômetro.

Não foi verificada diferença no componente PL entre os híbridos avaliados. Todos os genótipos apresentaram esporulação, aos três isolados testados, aos sete dias após a inoculação. Foram observadas diferenças significativas quanto à capacidade média de esporulação de *C. graminicola* entre os 15 genótipos de milho. Genótipos considerados como mais resistentes (resistência horizontal), com base nos resultados obtidos nas fases anteriores, apresentaram menor número de esporos /cm², ou seja, menor taxa de esporulação. Resultados inversos foram observados para os genótipos considerados suscetíveis.

Etapa 3

Os 15 genótipos de milho foram avaliados quanto à severidade da antracnose foliar em condição de campo. Foram utilizados os três isolados testados anteriormente. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, em arranjo de parcela subdividida, com 45 tratamentos (15 genótipos x 3 isolados) e três repetições. Os isolados foram dispostos nas parcelas e os híbridos nas subparcelas. A 0,5 m de cada parcela foram semeadas quatro linhas de 1,0 m de comprimento com um genótipo suscetível à antracnose. Essas linhas foram utilizadas para inoculação artificial dos

isolados e serviram como fonte de inóculo para as parcelas.

Os resultados demonstraram a inexistência de interação significativa entre as fontes de variação estudadas (isolados x genótipos) descartando-se, portanto, a possibilidade de existência de resistência vertical incompleta nos genótipos aos isolados utilizados. Foi observada, entretanto, variação significativa entre os genótipos de milho quanto à resistência horizontal a *C. graminicola*. As linhagens L2283, L141 e L182 e o híbrido 2B710 apresentaram os maiores níveis de resistência horizontal. Com base nos resultados, conclui-se que a elevada variabilidade patogênica observada em *C. graminicola* pode ser explicada pela existência de raças fisiológicas em sua população. Coexistem, no germoplasma de milho os dois tipos de resistência à antracnose, vertical e horizontal, com predominância da resistência do tipo horizontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa MPM (2001) Variabilidade patogênica de *Colletotrichum graminicola* isolado de milho (*Zea mays* L.). Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. ESALQ - Universidade de São Paulo.
- Coelho RMS, Silva HP, Brunelli KR, Camargo LEA (2001) Controle genético da antracnose foliar em milho. *Fitopatologia Brasileira* 26:640-643.
- Ferreira AS, Casela CR (2001) Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA - CNPMS. Circular Técnica, no. 13.
- Forgery WM, Blanco MH, Laagering WQ (1978) Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. *Plant Disease Reporter* 62:573-576.
- Nicholson RL, Warren HL (1981) The issue de races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. *Plant Disease* 65:143-145.
- Sicard D, Michalakis Y, Dron M, Neema C (1997) Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its hosts, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87:807-813.
- Silva HP (1983) Herança da resistência a antracnose foliar em milho (*Zea mays* L.) e métodos de avaliação. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. ESALQ - Universidade de São Paulo.
- White DG, Yanney J, Anderson B (1987) Variation in pathogenicity, virulence and aggressiveness of *Colletotrichum graminicola* on corn. *Phytopathology* 77:999-1001.

Colletotrichum Genomics

Lisa Vaillancourt. University of Kentucky, Lexington, Kentucky USA. E-mail: vaillan@email.ksu.edu

Topics to be discussed include: the current status and major findings of the on-going *Colletotrichum graminicola* genome project: the next step in developing genomic

resources for the *Colletotrichum* genus: and how the availability of genomics data will change the ways we can study *Colletotrichum* species as plant pathogens.