

Associação de Virulência de *Colletotrichum sublineolum* à Resistência Genética em Combinações de Linhagens de Sorgo.

¹SILVA, D. D.; ²CASELA, C. R.; ¹CASTRO, H. A.; ²SANTOS, F. G e ²FERREIRA, A. S

¹Universidade Federal de Lavras, cep 73200-000, Lavras, MG, e-mail: ddionisia@yahoo.com.br

²Embrapa Milho e Sorgo, cep 35701-970, Sete Lagoas, MG, e-mail: casela@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: *Colletotrichum sublineolum*, *Sorghum bicolor*, associação de virulência.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* Henn. in Kab. & Bubák, é a doença mais severa a afetar a cultura do sorgo no Brasil e está presente em todas as regiões de plantio desta gramínea no país. A doença causa perdas significativas à produção, especialmente quando ocorrem condições de alta umidade associadas a temperaturas elevadas. O seu controle é considerado prioritário pela indústria de produção de sementes, uma vez que as perdas na produtividade podem ser superiores a 80%, além de causarem esterilidade parcial de panículas e afetar drasticamente a qualidade das sementes. O seu controle é também fundamental para permitir uma possível expansão da área de plantio com a cultura no país. O método mais eficiente de controle da doença é a utilização de cultivares resistentes. Esta alternativa tem como entrave a alta variabilidade apresentada pelo patógeno, que possibilita a sua rápida adaptação às variedades e híbridos comerciais resistentes pelo surgimento de novas formas de virulência em sua população (Guimarães et al., 1999; Casela et al., 1998; Casela & Ferreira, 1987).

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido utilizando-se a infra-estrutura do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e casas-de-vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, no período de julho de 2004 a dezembro de 2005.

Foram avaliadas 10 linhagens elites do programa de melhoramento genético de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo, as quais foram inoculadas com 289 isolados monospóricos do patógeno obtidos nas localidades de Sete Lagoas, Uberlândia e Ipiacu, MG, Goiânia e Palmeira de Goiás, GO, e Jardinópolis, SP (Tabela 1).

TABELA 1: Linhagens de sorgo utilizadas como diferenciadoras para a caracterização de populações de *Colletotrichum sublineolum*.

Linhagens macho-estéreis ¹	Linhagens restauradoras
ATF8A	BR009 ²
ATF14A	BR012R
ATF54A	CMSXS180R
CMSXS206A	CMSXS182R
9409131	9910032

¹Foram utilizadas as mantenedoras B nos experimentos, ²Linhagem padrão de suscetibilidade.

Fragments de folhas apresentando sintomas da doença foram esterilizados superficialmente por 2 a 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e plaqueados em meio de farinha de aveia-agar (FAA). As placas foram, em seguida, incubadas sob luz fluorescente contínua à temperatura de 25⁰C por 7 a 8 dias. Seguiu-se uma raspagem superficial para a eliminação do crescimento micelial da colônia, 5 dias após o isolamento, para a indução de esporulação. Sete dias após, os conídios foram coletados por meio do corte de fragmentos do meio de cultura e transferidos para tubos de ensaio contendo 9mL de água destilada e esterilizada, seguindo-se uma diluição em série. Em seguida, 1mL da suspensão obtida foi distribuído em 3 placas de Petri contendo agar-água (AA) a 2%, as quais foram incubadas a 25⁰C, por 12 horas, para a indução de germinação. Culturas monospóricas foram, então, obtidas por meio da coleta de um conídio ao microscópio de luz. O conídio foi coletado pelo corte de um fragmento correspondente ao foco de luz do microscópio com peça desenvolvida especificamente para este fim. Os isolados, depois de transferidos para tubos de ensaio contendo FAA, foram incubados sob luz contínua por aproximadamente 7 dias, quando adicionou-se óleo mineral para conservação dos mesmos até o momento de uso.

Os isolados monospóricos foram transferidos do óleo mineral para placas de Petri com meio FAA e mantidos sob luz fluorescente contínua por 7 a 8 dias. Para indução de esporulação, realizou-se raspagem superficial aos 5 dias de crescimento e, após 5 a 6 dias, os isolados foram repicados para novas placas contendo FAA. Cinco dias depois, as placas de cada isolado foram inundadas com água destilada, seguindo-se uma raspagem superficial com uma espátula para a liberação de conídios e posterior contagem em câmara de Neubauer. A concentração de inóculo utilizada foi de 10⁶ conídios/mL.

As plantas de cada linhagem foram inoculadas aos 28 dias após o plantio com a suspensão de esporos do patógeno na proporção de 10mL/vaso. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 18 horas em casa de vegetação. Os tratamentos foram delineados em parcelas subdivididas com isolados nas parcelas e cultivares nas subparcelas com 3 repetições. Um vaso com 5 a 6 plantas caracterizou uma repetição

As plantas foram avaliadas para o tipo de infecção aos 12 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas com valores de 1 a 5, conforme Cardwel et al. (1989).

As notas transformadas para o tipo de reação (susceptível ou resistente) designaram as raças do fungo, segundo Nietzsche et al. (2001). As frequências de virulência foram calculadas para cada linhagem, em cada localidade, dividindo-se o número de isolados virulentos a um determinado genótipo pelo número total de isolados amostrados em uma determinada região. Para detectar a ocorrência de virulência associada ou dissociada a duas linhagens a e b, componentes da série diferencial, os isolados foram classificados em uma das quatro possíveis categorias de avirulência ou virulência: VaVb,; isolado virulento à linhagem a e b; VaAb,; isolado virulento à linhagem a e avirulento à linhagem b; AaAb, isolado avirulento a ambas as linhagens, e AaVb, isolado avirulento à linhagem a e virulento à linhagem b. Baseando-se nestes dados, foram calculadas as frequências, esperada e observada, de cada uma das quatro categorias de virulência e avirulência descritas acima. As frequências esperada e observada, em cada categoria, foram comparadas por meio do teste X² (Lebeda, 1981), utilizando-se o programa Genes, desenvolvido por Cruz (1996). As associações de patogenicidade e de virulência foram calculadas para cada combinação de linhagens a e b da série diferencial, por meio de coeficiente de associação de patogenicidade (CAP) e um coeficiente de associação de virulência (CAV) (Browder & Eversmeyer, 1977), conforme as seguintes expressões:

CAP = número de isolados AaAb + número de isolados VaVb/número total de isolados.

CAV = número de isolados VaVb/número total de isolados.

Resultados e Discussão

As freqüências de virulência a cada linhagem foram, em sua maioria, semelhantes entre si, nos seis locais amostrados. Observou-se uma menor proporção de isolados virulentos às linhagens macho-estéreis, principalmente aos genótipos ATF8A, ATF14A e 9409131A. A linhagem macho-estéril ATF14A apresentou baixas freqüências em todas as localidades, exceto em Goiânia e em Palmeira de Goiás, em que os valores para esta linhagem foram um pouco acima dos observados nas demais localidades (0,556 e 0,400, respectivamente) (Tabela 2).

Em Sete Lagoas e Goiânia, os valores de CAP e CAV foram, em sua maioria, altos e próximos entre si, em todas as combinações de linhagens analisadas. Em Goiânia, as combinações entre as linhagens BR012R x 9409131, CMSXS180R x 9409131A e 9910032R x 9409131A apresentaram baixos valores tanto de CAP quanto de CAV. Considerando-se as elevadas freqüências de virulência às linhagens R, nestes casos os baixos valores de CAV observados foram determinados apenas pela linhagem 9409131, comum a todos os pares analisados e que apresentam uma menor freqüência de virulência em relação às linhagens R.

Em Uberlândia, as maiores diferenças entre CAP e CAV foram observadas entre as linhagens macho-estéreis ATF8A, ATF14A e 9409131A, em combinação com as restauradoras BR012R e CMSX180R e entre ATF8A com a restauradora 9410032R. Em Ipiaçu, todas as combinações apresentaram valores aproximados entre CAP e CAV, sendo observadas tanto combinações com altos CAP e CAV quanto combinações em que dois coeficientes apresentaram valores baixos. Valores próximos são indicativos de que estas combinações não oferecem potencial para gerar híbridos com resistência às raças prevalentes neste local.

Em Palmeira de Goiás, altas diferenças entre valores de CAP e de CAV foram obtidas nas combinações entre todas as linhagens restauradoras e a linhagem CMSXS206A. As outras combinações apresentaram valores de CAP e CAV bem próximos entre si, indicando a ocorrência de uma maior proporção de isolados na população com virulência associada às duas linhagens utilizadas nas combinações. Duas combinações com altos valores de CAP e baixos valores de CAV foram identificadas em Jardinópolis, entre a restauradora BR 012R e as macho-estéreis ATF8A e ATF14A. As combinações dessas mesmas linhagens macho-estéreis e a CMSXS182R apresentaram diferenças relativamente altas entre CAP e CAV (0,507 e 0,333, respectivamente), para as duas combinações. De acordo com Browder & Eversmeyer (1977), combinações com alto CAP e baixo CAV são capazes de, potencialmente, gerar híbridos com resistência de alta durabilidade, enquanto combinações com altos valores de CAP e altos valores de CAV não têm, por outro lado, combinações capazes de gerar resistência de alta durabilidade, pois, a maior proporção da população patogênica já é capaz de infectar ambas as linhagens da combinação. Partindo-se desta afirmativa, pode-se supor, de acordo com os resultados deste trabalho, que nenhum híbrido gerado pelas combinações entre as linhagens R e a linhagem ATF54A seria potencialmente resistente a *C. sublineolum*. Muitas combinações, por outro lado, apresentaram baixos valores para CAP e CAV, simultaneamente. Neste caso, os híbridos resultantes teriam a sua resistência determinada por apenas uma das linhagens componentes do cruzamento.

Considerando-se as combinações entre linhagens restauradoras, todas apresentaram altos

TABELA 2: Frequência de virulência de *C. sublineolum* a 10 linhagens de sorgo.

Genótipos	Número de raças (N) na amostra e frequência de virulência por região											
	Sete Lagoas		Uberlândia		Ipiacaú		Goiânia		Palmeira de		Jardinópolis	
	N=21 ¹		N=24		N=20		N=18		N=10		N=32	
	R.V. ²	F.V. ³	R.V.	F.V.	R.V.	F.V.	R.V.	F.V.	R.V.	F.V.	R.V.	F.V.
BR009	21	1,000	24	1,000	20	1,000	18	1,000	10	1,000	32	1,000
BR012R	17	0,810	15	0,625	19	0,950	18	1,000	8	0,800	8	0,250
CMSXS180R	21	1,000	19	0,792	20	1,000	17	0,944	7	0,700	27	0,844
CMSXS182R	17	0,810	18	0,750	18	0,900	14	0,778	8	0,800	23	0,719
9910032R	20	0,952	19	0,792	16	0,800	16	0,889	8	0,800	26	0,813
ATF8A	7	0,333	6	0,250	5	0,250	7	0,389	4	0,400	6	0,188
ATF14A	8	0,381	6	0,250	7	0,350	10	0,556	4	0,400	9	0,281
ATF54A	17	0,810	18	0,750	16	0,800	13	0,722	8	0,800	23	0,719
CMSXS206A	8	0,381	13	0,542	10	0,500	11	0,611	1	0,100	19	0,594
9409131A	9	0,429	6	0,250	4	0,200	5	0,278	3	0,300	17	0,531

¹Número de raças detectadas na região. ²Número de raças virulentas à linhagem. ³Frequência de virulência por

valores de CAP e de CAV, em todas as localidades amostradas, exceção feita às combinações entre a linhagem BR012R e as linhagens CMSXS180R, CMSXS182R e 9910032R, que apresentaram baixos CAP e CAV em Jardinópolis. Deste modo, é importante que sejam identificadas fontes de resistência restauradoras de fertilidade capazes de gerar descendentes com alta resistência em cruzamentos.

Por outro lado, combinações entre macho-estéreis apresentaram altos CAP e baixos CAV em várias localidades amostradas. Duas combinações apresentaram CAV igual a zero, em Palmeira de Goiás, ATF14A x CMSXS206A e CMSXS206A x 9409131A.

De acordo com a análise da estrutura de virulência das populações de *C. sublineolum* amostradas não se observou a ocorrência de virulência dissociada às combinações entre linhagens R e A, o que foi confirmado estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade. Portanto tais combinações não são indicadas para a geração de híbridos com resistência à antracnose nas localidades amostradas.

A ocorrência de associações positivas de virulência observada neste trabalho já havia sido observada anteriormente por Casela & Ferreira (1995). Este fato pode ser determinado, pelo menos em parte, pela ausência de processos sexuais em *C. sublineolum* em sorgo. Neste caso, determinadas combinações de genes de virulência podem permanecer na população, ainda que estes genes não estejam necessariamente ligados (Wolfe & Knott, 1982).

As altas frequências de virulência às linhagens restauradoras CMSXS180R e CMSXS182R, em todos os locais amostrados diferiram daquelas relatadas por Casela et al. (1998), que verificaram uma alta resistência destas linhagens às populações de *C. sublineolum* predominantes em Sete Lagoas, MG; Pelotas, RS e Jataí, GO. Ambas as linhagens têm como um de seus progenitores a restauradora BR005R (SC326-6) que é usada como fonte de resistência no programa de melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo. Provavelmente, estes genótipos já exerciam, direta ou indiretamente por meio do gene ou dos genes de resistência da linhagem progenitora BR005R, alguma pressão de seleção sobre a população do patógeno a favor de raças virulentas a estes genótipos. Este fato dá suporte à já relatada, alta capacidade adaptativa de *C. sublineolum* (Casela et al., 2004; Guimarães et al., 1999; Casela & Ferreira, 1987). É

recomendável, portanto, um estudo sobre a genética da resistência de tais genótipos que forneça informações a respeito da herança visando a sua melhor utilização em programas de melhoramento genético.

Referências Bibliográficas

BROWDER, L.E.; EVERSMEYER, M.G. Pathogenicity associations in *Puccinia recondita tritici*. **Phytopathology**, v.67, p.766-771, 1977.

CARDWEL, K.F.; HEPPELRY, P.R.; FREDERIKISEN, R.A. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and transmission of sorghum anthracnose. **Plant Disease**, v.73, p.255-257, 1989.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. Reação de genótipos de sorgo a sete patótipos de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.1, p.60-62, 1987.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. Associações de virulência em *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.2, p.33-38, 1995.

CASELA, R.C.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, F.G. Associação de virulência de *Colletotrichum graminicola* à resistência genética em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.2, p.143-146, 1998.

CASELA, R.C.; SANTOS, F.G.; FERREIRA, A.S. Race diversity and complexity in populations of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.30-37, 2004.

CRUZ, C.D. **Programa genes**. Viçosa: UFV. Departamento de Biologia Geral, 1996.

GUIMARÃES, F.B. et al. Avaliação da estabilidade fenotípica e previsibilidade da resistência de cultivares de sorgo a *Colletotrichum graminicola*. **Summa Phytopathologica**, v.25, n. 1, p.09-13, 1999.

LEBEDA, A. Population genetics of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). **Phytopathology**, v.71, p.228-239, 1981.

MUNDT, C.C. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. **Phytopathology**, v.80, n.3, p.221-223, 1990.

MUNDT, C.C. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids: further comments. **Phytopathology**, v.81, n.3, p.240-242, 1991.

NIETSCHE, S. A. et al. Genetic diversity of *Phaeoisriopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, v.117, p.77-84, 2001.

WOLFE, P.S.; KNOTT, D.R. Populations of plant pathogens: some constraints on analysis of variation in pathogenicity. **Plant Pathology**, v.31, p.79-90, 1982.