

spp.) a *Alternaria solani*. Fitopatol. bras. 10:597-604. 1985.
REIFSCHNEIDER, F.J.B., FURUMOTO, O. & FILGUEIRA, F.A.R. Illustrated key for the evaluation of early blight of potatoes. FAO Plant Prot. Bull. 32(3):91-4. 1984.
RICH, A.E. Potato diseases. Ac. Press, NY. 1983. 238p.

SHAHIM, E.A. & SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. Phytopathology 69:618-20. 1979.
TOKESHI, H. & BERGAMIN, A. Doenças da batata (*Solanum tuberosum* L.) In: Ed. Agronômica CERES Ltda. Manual de fitopatologia, Vol. II. S. Paulo, Ed. Agron. CERES Ltda., 1980. p. 102-20.

DIFERENCIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA* DO SORGO

EDILSON PAIVA, MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS DINIZ PEIXOTO, ALEXANDRE DA SILVA FERREIRA & CARLOS ROBERTO CASELA

Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo-EMBRAPA, Caixa Postal 151, 35700 Sete Lagoas, MG

(Aceito para publicação em 23/07/90)

RESUMO

PAIVA, E., PEIXOTO, M.J.V. DE V.D., FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. Diferenciação imunológica de raças fisiológicas de *Colletotrichum graminicola* do Sorgo. Fitopatol. bras. 15:299-302. 1990.

Isolados monospóricos de *Colletotrichum graminicola* obtidos em plantas de sorgo, nas localidades de Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS), e Quixadá (CE) foram multiplicados em meios de cultura e seus esporos utilizados como antígenos imunizantes para produção de anticorpos em coelhos. Comparações sorológicas entre os três isolados foram feitas através de técnicas de imunodifusão dupla e

imunoeletroforeses. Os padrões de precipitação em testes de imunodifusão dupla não mostraram diferença sorológica entre os isolados. Contudo, diferenças na área e/ou altura de picos de precipitação, detectados através de imunoeletroforese, permitiram separar com precisão os três isolados de *C. graminicola* em raças fisiológicas distintas.

ABSTRACT

Immunological differentiation of physiological races of *Colletotrichum graminicola* of sorghum.

Single-spore isolates of *Colletotrichum graminicola*, obtained from infected sorghum fields at Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS), and Quixadá (CE) were grown in agar medium, and spores from the cultures were used to induce antibody formation in rabbits. Serological comparisons among the three isolates were made by double immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In

double immunodiffusion tests, no serological difference was detected among the isolates. However, the differences in area and/or height of precipitin peaks, as detected by immunoelectrophoresis, permitted clear separation of the three isolates of *C. graminicola* into distinct physiological races.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que ocorrem na cultura do sorgo, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola*, é responsável pelas maiores perdas de produção (Fernandes & Schaffert, 1978; Ferreira & Warrem, 1982).

A ocorrência de raças patogênicas de *C. graminicola* foi demonstrada através de reação diferencial de cultivares de sorgo a diferentes isolados do patógeno (Frederiksen & Rosenow, 1971; Pastor-Corrales & Frederiksen, 1978; Nakamura, 1982; Ferreira & Casela, 1986). Como o controle mais eficiente de antracnose é obtido através do emprego de cultivares resistentes, há necessidade de uma melhor caracterização das raças fisiológicas do patógeno, como subsídio a programas de melhoramento de sorgo que visam resistência ao *C. graminicola*.

Dentre os métodos hoje empregados pelos micologistas na taxonomia, na classificação e na identificação de fungos, destaca-se a sorologia (Seeliger, 1968; Figueiredo *et al.*, 1977). A alta especificidade das reações sorológicas,

determinada pela afinidade entre anticorpos e antígenos, ultrapassa a sensibilidade de praticamente todos os métodos químicos e bioquímicos hoje conhecidos (Figueiredo *et al.*, 1977).

Na micologia fitopatológica, técnicas sorológicas de imunodifusão e imunoeletroforese foram utilizadas com sucesso para separar espécies morfológicamente semelhantes dentro dos gêneros *Ceratocystis* (Amos & Burrell, 1967), *Ascochyta* (Madhosingh & Wallen, 1967; Figueiredo & Namekata, 1974), *Botrytis* (Ghini & Kimati, 1985), *Phytophthora* (Merz *et al.*, 1969), as raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* (Buxton *et al.*, 1961), e de *Rhizoctonia solani* (Adams & Butler, 1979).

Isolados de *C. gloeosporioides* de manga e cebola foram caracterizados sorologicamente através de imunodifusão (Bajungu, 1979). Por procedimento análogo, Kimati (1975) demonstrou a existência de formas especiais sacchari, zeae e sorghi em isolados de *C. graminicola*, obtidos em cana-de-açúcar, milho e sorgo; e Geraldini & Kimati (1982) mostraram que isolados de *C. graminicola* do

trigo são sorologicamente diferentes das formas especiais sacchari e sorghi, surgindo a designação de forma specialis secalis para os isolados de *C. graminicola* do trigo.

No presente trabalho, o objetivo foi diferenciar sorologicamente, através de imunodifusão e imunoeletroforeses, raças fisiológicas de *C. graminicola* isoladas do sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de biologia molecular e de fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo-CNPMS, localizado em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Isolados de *C. graminicola* foram obtidos de folhas naturalmente infectadas, coletadas nas localidades de Sete Lagoas (MG), Pelotas (RS) e Quixadá (CE) (Ferreira & Casela, 1986). Culturas monospóricas de cada isolado foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Ferreira & Warren (1982). A preparação de esporos, utilizados como antígenos imunizantes e reagentes, foi feita por adição de 10 ml de solução tampão salino de fosfato (TSF), pH 7,4 (0,14 M NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mM KCl), em placas de Petri contendo culturas do fungo com sete dias de idade, que apresentavam esporulação abundante. Os esporos foram liberados por raspagem superficial, com auxílio de um pincel, sendo a suspensão obtida filtrada em uma peneira de 42 mesh e centrifugada a 3000 g por 3 min. Após descartar o sobrenadante o precipitado foi ressuspenso em igual volume de TSF e centrifugado uma segunda vez. Suspensões contendo 10^8 conídios/ml foram preparadas, e armazenadas a -20°C .

Para produção de anticorpos, 2 ml de suspensão de esporos foram emulsionados com igual volume de adjuvante completo de Freund e injetados em quatro regiões diferentes nos músculos das coxas de um coelho. Injeção similar, utilizando adjuvante incompleto de Freund, foi feita quinze dias após a primeira. As sangrias foram realizadas através da veia marginal da orelha, sendo a primeira sete dias após a última inoculação e as demais a intervalos de quatro dias. Para preparação do anti-soro, o sangue foi incubado por duas horas à temperatura ambiente, seguido por incubação de doze horas a 5°C e centrifugação a 3000 g por 10 min. A titulação dos anti-soros foi obtida por imunodifusão dupla, utilizando fator de diluição 2^n ($n = 1, \dots, 5$) e a especificidade dos mesmos também determinada por imunodifusão dupla, utilizando anti-soro pré-imune e extratos de meios não inoculados. A conservação do anti-soro obtido foi feita a -20°C , em alíquotas de 1 ml.

Imunodifusão dupla e imunoeletroforeses foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Ouchterlony & Nilsson (1973), com as seguintes modificações: A imunodifusão foi realizada em géis de 1 % de agarose, fundida em tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,02% NaN_3 solidificada em um suporte de plástico especial ("GelBond film FMC"), numa espessura média de 1 mm. O antígeno reagente consistiu de suspensões de esporos contendo 10^8 conídios/ml; anti-soros com títulos de 1:32 foram empregados em diluições 1:2 em TSF. Após difusão por 24 horas à temperatura ambiente, as linhas de imunodifusão foram visualizadas através de coloração com "coomassie blue". No processo de coloração as géis foram lavadas em solução de 0,1 M NaCl, 0,02% NaN_3 , 3 vezes de 4 horas cada. Após secas e incubadas por 3 min em "coomassie" 0,5% em 50% etanol + 10% ácido acético, foram lavadas em 50% etanol + 10% ácido acético.

Para imunoeletroforeses, as géis foram fundidas em tampão contendo 25mM tricina pH 8,6, divididas em duas

regiões: (i) região de amostras sem anti-soro e (ii) região de reação com anti-soro, na proporção de $40 \mu\text{l}$ de anti-soro com título de 1:32 por ml de gel. Foi realizada eletroforese na região de amostras por 1 hora a 7 V/cm e na região de reação por 4 horas. A visualização das linhas de precipitação foi feita pelo método de coloração descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os títulos dos anti-soros obtidos nas diferentes sangrias variaram de 1:8 a valores acima de 1:32 com a maioria na faixa de 1:32 (Quadro 1). Nas diluições menores do soro (1:2, 1:4) pode-se observar com clareza o aparecimento de pelo menos três linhas de precipitação distintas, indicando que o processo de preparo do antígeno imunizante e o esquema de imunização foram adequados pois, produziram alto título em imunodifusão dupla e um número razoável de linhas de precipitação.

TABELA 1 – Títulos dos anti-soros das diferentes sangrias, representados pela maior diluição onde se pode observar linhas visíveis de precipitação pela técnica de imunodifusão dupla em agarose.

Sangrias	Antígenos/Anti-soros*		
	Pelotas	Quixadá	Sete Lagoas
	Diluições		
1 Pré-imune	0	0	0
2	1:32	1:8	1:32
3	>1:32	1:16	1:32
4	1:32	1:16	1:32
5	1:32	>1:32	1:32
6	1:32	>1:32	1:32
7	1:16	1:16	1:32

*Foram diluídos pelo fator 2^n ($n = 1, \dots, 5$).

Na Figura 1, são apresentados os padrões de precipitação de reações homólogas e heterólogas envolvendo antígenos e anti-soros dos três isolados do fungo. Como pode ser observado, para todas as combinações antígeno-anti-soro houve a formação de três linhas de precipitação distintas e complementares entre si, sem a formação de esporão, indicando a existência de três antígenos principais, comuns aos três isolados. Não foi evidenciada a ocorrência de nenhum antígeno específico.

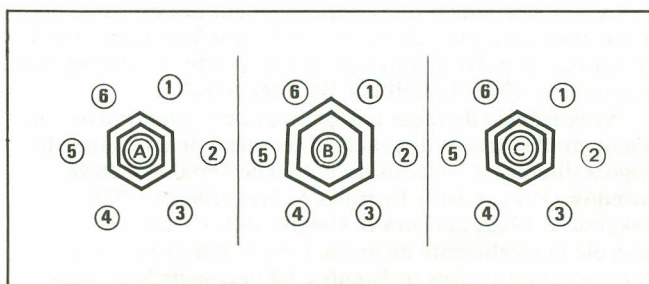


FIGURA 1 – Diagramas representativos de padrões de precipitação de reações homólogas e heterólogas de imunodifusão dupla envolvendo nos buracos centrais da gel anti-soro do isolado de Pelotas (A), Sete Lagoas (B), Quixadá (C) e nos buracos laterais antígenos do isolado de Pelotas (1 e 4), Sete Lagoas (3 e 6) e Quixadá (2 e 5).

Estes resultados mostraram que os três isolados de *C. graminicola* foram sorologicamente idênticos, quando comparados entre si pelo teste de imunodifusão dupla. Ferreira & Casela (1986), no entanto, utilizando reação diferencial de cultivares de sorgo demonstraram que os três isolados comportam-se diferentemente entre si, o que sugere tratarem-se de raças fisiológicas de *C. graminicola*.

Para obter uma melhor resolução das reações de precipitação, e assim detectar diferenças a nível de raça fisiológica, utilizou-se técnicas de imunoeletroforese, que consistem na separação de antígenos por eletroforese combinada com reações sorológicas. O método permite individualizar linhas de precipitação coincidentes, quantificar antígenos em reações homólogas e determinar a especificidade em reações heterólogas. A Figura 2 mostra os padrões de precipitação obtidos por imunoeletroforese simples envolvendo antígenos dos três isolados *versus* o anti-soro do isolado de Pelotas. Constatou-se uma melhor separação dos antígenos com o aumento do número de linhas de precipitação de três para quatro, em comparação com a imunodifusão dupla (Figura 1). Como a altura e/ou a área dos picos é diretamente proporcional à quantidade e/ou especificidade dos antígenos (Nowotny, 1979), detectou-se, nos padrões de precipitação obtidos, a existência de diferenças entre antígenos dos três isolados. Estas diferenças foram ainda mais visíveis na Figura 3, onde a separação dos antígenos foi feita por imunoeletroforeses dupla. Os padrões de precipitação envolvendo antígenos e anti-soros dos isolados mostraram a presença de seis antígenos principais comuns aos três isolados, com a altura e/ou área de alguns picos variando consideravelmente. Como nos resultados obtidos por imunodifusão dupla, não houve a ocorrência de antígenos específicos nos testes de imunoeletroforese, verificando-se que os isolados pertencem à mesma espécie (*C. graminicola* forma *specialis* sorghi). Entretanto, a diferença observada na área e/ou altura de picos correspondentes a antígenos comuns (Figuras 1 e 2), indica a existência de quantidades e/ou especificidade diferentes. Estas diferenças entre antígenos comuns, detectadas através dos padrões de precipitação em imunoeletroforese, separaram com precisão estes três isolados de *C. graminicola* em raças fisiológicas distintas. Isto confirma, a nível molecular, os resultados obtidos por Ferreira & Casela (1986), evidenciando a potencialidade das técnicas sorológicas no estudo das relações filogenéticas de fungos fitopatogênicos.

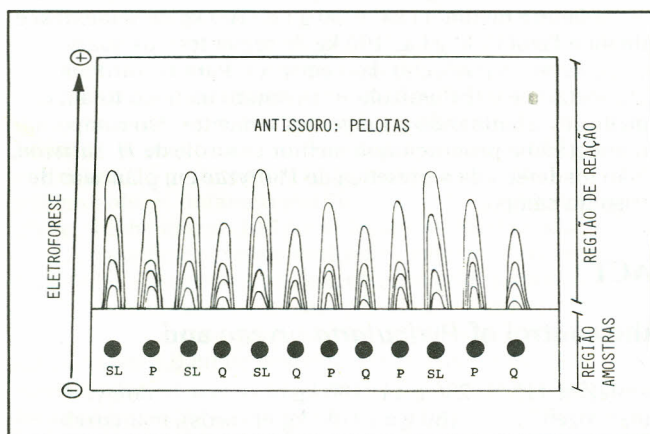


FIGURA 2 – Diagramas representativos de padrões de precipitação de reações homogêneas e heterólogas de imunoeletroforese simples (uma direção) envolvendo antígenos dos três isolados: Sete Lagoas (SL), Pelotas (P), Quixadá (Q) e anti-soro do isolado de Pelotas.

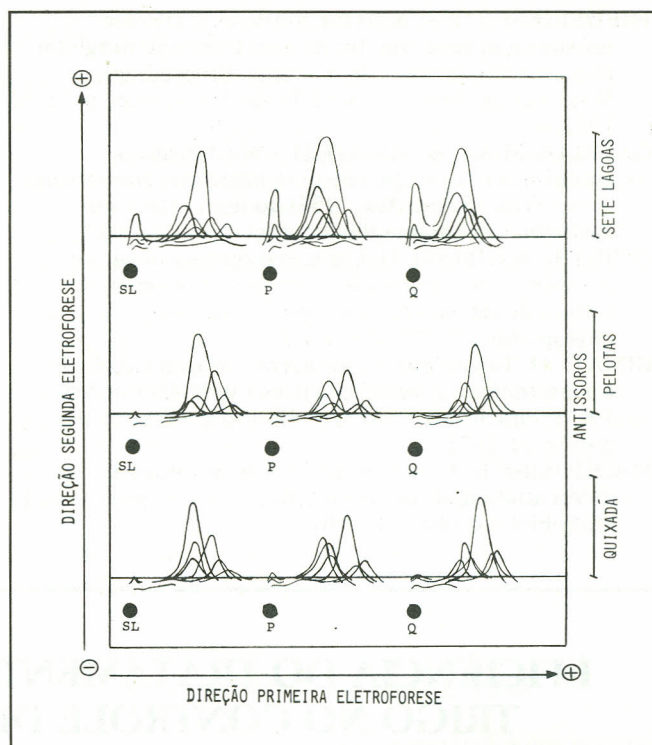


FIGURA 3 – Diagramas representativos de padrões de precipitação de reações homogêneas e heterólogas de imunoeletroforese dupla (duas direções) envolvendo antígenos dos três isolados: Sete Lagoas (SL), Pelotas (P), Quixadá (Q) e seus respectivos anti-soros.

LITERATURA CITADA

- ADAMS JR., G.C. & BUTLER, E.E. Serological relationships among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 69:629-633. 1979.
- AMOS, R.E. & BURREL, R.G. Serological differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology*, 53:32-34. 1967.
- BAJUNGU, H.E. Caracterização patogênica, sorológica e fisiológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957) f. sp. cepae n. c. Piracicaba. ESALQ/USP, 35 p. (Tese Mestrado) 1979.
- BUXTON, E.W., CULBRETH, W., ESPOSITO, R.G. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 51:575-578. 1961.
- FERNANDES, F.T., SCHAFFERT, R.E. Antracnose of sorghum in Brazil. In: International Workshop on Sorghum Disease. Hyderabad, Índia. Proceedings. Andhra Pradesh, ICRISAT. p. 295-296. 1978.
- FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. Raças patogênicas de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Fitopatol. bras.* 11:83-87. 1986.
- FERREIRA, A.S. & WARREN, H.L. Resistance of sorghum to *Colletotrichum graminicola*. *Plant Dis.* 66:773-775. 1982.
- FIGUEIREDO, M.B., ALBA, A.P.C., OLIVEIRA, A.R. Sorologia aplicada ao estudo de fungos fitopatológicos. *Summa Phytopathol.* 3:233-259. 1977.
- FIGUEIREDO, M.B. & NAMEKATA, T. *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e outros fungos do gênero *Ascochyta*. I. Sorologia e sua aplicação na sistemática. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 41:67-93. 1974.

- FREDERIKSEN, R.A. & ROSENOW, D.T. Disease resistance in sorghum. In: Annual Corn and Sorghum Research Conference, 26, Chicago. Proceedings. Washington, American Seed Trade Association. p. 71-82. 1971.
- GERALDI, M.A.P. & KIMATI, H. Caracterização patogênica e sorológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu Arx, 1957) do trigo (*Triticum aestivum* L.). Summa Phytopathol. 8:16-28. 1982.
- GHINI, R. & KIMATI, H. Caracterização sorológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura de cebola (*Allium cepa* L.). Summa Phytopathol. 11:127-139. 1985.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu Arx, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 130 p. (Tese de livre docência). 1975.
- MADHOSINGH, C. & WALLEN, V.R. Serological differentiation of the *Ascochyta* species on peas. Can. J. Microbiol. 14:449-451. 1967.
- MERZ, W.G., BURREL, R.G. & GALLEGLY, M.E. A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. Phytopathology, 59:367-370. 1969.
- NAKAMURA, K. Especialização fisiológica em *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu Arx). Jaboticabal, FCAVJ. 147 p. (Tese de livre docência). 1982.
- NOWOTNY, A. Crossed immunoelectrophoresis. In: Basic Exercises in immunochemistry, A Laboratory Manual. 2. ed., New York, Springer-Verlag, p. 240-243. 1979.
- OUCHTERLONY, O. & NILSSON, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: D.M. Weir (ed) Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 19:1-19. 34. 1973.
- PASTOR-CORRALES, M.A. & FREDERIKSEN, R.A. Sorghum anthracnose. In: International workshop on Sorghum Disease. Hyderabad, India. Proceedings. Andhra Pradesh, ICRISAT. p. 289-294. 1978.
- SEELIGER, H.P.R. Serology as an aid to taxonomy. In: The Fungi. Ed. Ainsworth. G.C. & Sussman, A., London. 3:597-624. 1968.

EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES DE TRIGO NO CONTROLE DE *PYRICULARIA ORYZAE* E *COCHLIOBOLUS SATIVUS* (*HELMINTHOSPORIUM SATIVUM*)

A.C.P. GOULART, A.N. DE MESQUITA & F. DE A. PAIVA

Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Dourados/EMBRAPA, Caixa Postal 661, 79800 Dourados, MS

(Aceito para publicação em 14/11/90)

RESUMO

GOULART, A.C.P., MESQUITA, A.N. DE & PAIVA, F. DE A. Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de *Pyricularia oryzae* e *Cochliobolus sativus* (*Helminthosporium sativum*). Fitopatol. bras. 15:302-305. 1990.

O objetivo deste experimento foi avaliar a eficiência de diferentes fungicidas, isolados ou em mistura, no tratamento químico de sementes de trigo para o controle de *Pyricularia oryzae* e *Helminthosporium sativum*. Para os testes de laboratório ("blotter test") e de campo, foram utilizadas sementes da cultivar Anahuac, com nível de 10,0% de contaminação natural com *P. oryzae* e 45,5% com *H. sativum*. Todos os fungicidas reduziram a incidência de ambos os patógenos nas sementes de trigo. Para *P. oryzae*, o melhor controle foi obtido com thiram + iprodione (150 + 50 g i.a./100 kg de sementes), carboxin (185 g i.a./100 kg de sementes), triadimenol + anilazine (15 + 200 g

i.a./100 kg de sementes), benomyl + mancozeb (50 + 160 g i.a./100 kg de sementes), mancozeb (160 g i.a./100 kg de sementes), etiltrianol (15 g i.a./100 kg de sementes), iminocadine (62,5 g i.a./100 kg de sementes), triflumizole + tiofanato metílico (30 + 90 g i.a./100 kg de sementes) e thiabendazol (100 g i.a./100 kg de sementes), os quais erradicaram o patógeno das sementes. Para *H. sativum*, iminocadine e triflumizole + tiofanato metílico foram os melhores, eliminando o fungo das sementes. No campo, iminocadine proporcionou melhor controle de *H. sativum*. Não foi detectada a presença de *P. oryzae* em plântulas de trigo no campo.

ABSTRACT

Efficiency of chemical treatment of wheat seeds on the control of *Pyricularia oryzae* and *Cochliobolus sativus* (*Helminthosporium sativum*).

The aim of this work was to evaluate the efficiency of fungicides applied as seed dressing on the control of *Pyricularia oryzae* and *Helminthosporium sativum*. In lab and field tests, seeds of the wheat cultivar 'Anahuac' with 10.0% and 45.5% of natural contamination with *P. oryzae* and *H. sativum*, respectively, were used. All chemical treatments reduced the incidence of both pathogens. Thiram + iprodione (150 + 50 g a.i./100 kg of seeds), carboxin (185 g a.i./100 kg of seeds) triadimenol +

anilazine (15 + 200 g a.i./100 kg of seeds), benomyl + mancozeb (50 + 160 g a.i./100 kg of seeds), mancozeb (160 g a.i./100 kg of seeds), etiltrianol (15 g a.i./100 kg of seeds), iminocadine (62,5 g a.i./100 kg of seeds), triflumizole + methyl tiophanate (30 + 90 g a.i./100 kg of seeds) and thiabendazol (100 g a.i./100 kg of seeds) were the best in the control of *P. oryzae*, eliminating this pathogen on the treated seeds. Iminocadine and triflumizole + methyl tiophanate were the best on the