

Caracterização de Isolados de *Claviceps* spp., Obtidos de Sorghum bicolor e Gramíneas Forrageiras, no Brasil. [Previous](#) [Top](#) [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

ZULEIDE M. CHAVES^{1(*)}, ELIANE A.GOMES², IVANILDO E. MARRIEL²,
CARLOS R. CASELA², ALEXANDRE DA S. FERREIRA² E LUDWIG H.
PFENNING¹

¹Departamento de Fitopatologia/Universidade Federal de Lavras, CP 37, 37200-000, Lavras, MG; ²EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; *zuleide@ufla.br

Palavras-chave: "Ergot", DNA ribossômico, *Claviceps* spp., *Sphacelia* sp.

Introdução

A doença açucarada ou "ergot" do sorgo tem sido relatada em diversos países da África, Ásia e América. Esta doença é importante na produção e qualidade de sementes híbridas, devido à alta susceptibilidade das linhagens macho-estéreis (Frederickson et al., 1991). No Brasil, a doença foi constatada em 1995 em toda a região Centro-Sul e o agente etiológico, identificado como *Claviceps sorghi* (Ferreira e Casela, 1995). Posteriormente, este agente foi identificado como *C. africana* Frederickson, Mantle & Milliano (Reis et al., 1996). Em 1997, foi confirmada a presença de *C. africana* no Brasil, ocorrendo em sorgo-forrageiro (Bogo e Boff, 1997).

Este patógeno apresenta dois tipos de frutificação: a frutificação teleomórfica, originária da germinação dos esclerócios, e a frutificação anamórfica, conidial, presente na exsudação açucarada das flores infectadas (Mughogho, 1986). A fase assexuada ou anamórfica foi estabelecida como *Sphacelia sorghi* por McRae, em 1917 (Bandyopadhyay et al., 1998). Kulkarni et al. (1976) descreveram a fase sexuada de *S. sorghi* como *C. sorghi* Kulk., Seshadri & Hegde, incluindo os patógenos asiático e africano. Entretanto, Frederickson e Mantle (1988) e Frederickson et al. (1989, 1991) demonstraram existir diferenças consideráveis entre as espécies das duas regiões, justificando colocar o patógeno africano como uma nova espécie de *Claviceps*, denominada *C. africana*. Em 1999, uma nova espécie foi descrita no Japão como *C. sorghicola* Tsukib., Shiman. e T. Uematsu, causando "ergot" em sorgo (Tsukiboshi et al. 1999).

As três espécies que infectam sorgo distinguem-se, principalmente, devido à morfologia do teleomorfo (características do estipe, capítulo, ascos e ascósporos), morfologia dos esclerócios (pequeno e arredondado em *C. africana* e alongado e protudente em *C. sorghi*), presença de alcalóides no esclerócio e habilidade para produzir conídios secundários (Pazoutová et al., 2000). Nos estudos realizados no Brasil não foi constatada a formação da fase teleomórfica por meio da germinação de esclerócios do fungo e, portanto, a identificação de *C. africana* foi feita utilizando as características morfológicas da fase anamórfica. Estudos comparativos dos macroconídios presentes na mela de várias gramíneas demonstraram ocorrer grande variação morfológica nestas estruturas, o que permitiu separá-los em grupo em função dos hospedeiros (Loveless, 1964, Nogueira, 1998).

Neste trabalho objetivou-se realizar a caracterização molecular de *Claviceps* spp., isolados de sorgo e de gramíneas forrageiras, no Brasil, por meio do seqüenciamento da região ITS do DNA ribossômico (rDNA); esclarecer a posição taxonômica e caracterizar morfológicamente o patógeno. Os estudos filogenéticos dos isolados de *Claviceps* spp do Brasil, comparando com isolados de outras regiões do mundo, poderão determinar as prováveis fontes da introdução do patógeno no Brasil.

Material e Métodos

Foram coletadas panículas de sorgo e de gramíneas forrageiras infectadas com *Claviceps* spp. nos municípios de Lavras, Montes Claros, Sete Lagoas e Uberlândia (MG), Lages (SC) e Jardinópolis (SP) (Tabela 1).

Para a montagem de lâminas, utilizaram-se de gotas da mela fresca. Com uma alça de platina foram retirados uma gota da panícula, colocada na lâmina com corante azul de algodão e coberta com uma lamínula. As lâminas foram observadas utilizando-se um microscópio Axioplan de contraste de fase com fluorescência da marca Zeiss, para realizar as medidas morfológicas e os registros fotográficos.

Gotas da mela, presentes nas panículas infectadas, foram retiradas com uma alça de platina e plaqueadas em meio de cultura BDA enriquecido com vitaminas (biotina e pirimidina) e micronutrientes. Acrescentou-se 100 µL de água (destilada e esterilizada) e espalhou-se com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em temperatura ambiente e observadas diariamente. Após o surgimento das primeiras colônias, estas eram transferidas para outra placa, visando a obtenção de culturas puras. Culturas puras de 10 isolados foram cultivadas em meio líquido BDA a 25°C, por 10 dias.

O DNA foi extraído de 0,5 g de micélio fresco de fungos crescendo em meio líquido, usando a técnica descrita por Lee e Taylor (1990). Utilizaram-se os "primers" ITS1 e ITS2 para amplificar a região ITS1 do rDNA. As reações de PCR foram feitas segundo protocolo de Pazoutová et al. 2000. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o protocolo de purificação das bandas com o kit "Gel Extraction" da Qiagen.

O seqüenciamento do DNA foi feito no seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems Hitachi) utilizando-se os primers ITS1 e ITS2, separadamente e o kit "Big Dye Terminator" v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com recomendações dos fabricantes. As seqüências de DNA obtidas foram analisadas pelo programa Blast N (Altschul et al., 1997) e alinhadas pelo método de Clustal W, versão 1.82 (Thompson et al., 1994). As seqüências foram comparadas com o "GenBank" Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados e Discussão

Foram comparadas as dimensões e o formato dos macroconídios presentes na mela dos 15 materiais coletados de panículas infectadas descritos na Tabela 1. Observou-se uma semelhança entre os materiais que infectavam as duas espécies de sorgo. Os macroconídios são oblongos a ovais, com dimensões variando de 10-20 x 5-8 µm, presença de poucos microconídios, e alguns macroconídios germinados para formar os conídios secundários. As amostras de *P. maximum*, os macroconídios têm dimensões 13-20 µm x 4-6µm e formato elípticos e os de *B. brizantha* e *B. decumbens* têm dimensões 11-19 µm x 3-5 µm e formato oblongo a levemente alantóide (Figura 1). As características morfológicas dos macroconídios se assemelham às descritas por Loveless (1964), o qual utilizou-se da fase assexuada de *Claviceps* (= *Sphacelia*) para diferenciar as espécies. Os isolados de sorgo formaram colônias brancas, felpudas e com micélio aéreo e com crescimento lento em meio BDA. Já os isolados de *Brachiaria* e *P. maximum*, formaram colônias brancas, com aspecto úmido, lisas e achatadas, com pouco micélio aéreo e crescimento rápido em BDA.

A amplificação da região ITS 1 do rDNA resultou em fragmentos de aproximadamente 250 pares de bases de cada um dos isolados analisados. Análises preliminares das seqüências de nucleotídeos dos isolados de *S. bicolor* e um isolado de *S. verticilliflorum* indicam tratar-se de *C. africana*. Embora, existam três espécies de *Claviceps* que infectam o sorgo (Pazoutová et al., 2000) e ocorra uma certa especificidade entre patógeno-hospedeiro (Pazoutová, 2001), foi verificado que a mesma espécie do patógeno infectou duas espécies de sorgo. Nos isolados de *P. maximum* e *B. brizantha* cv Marandu e de *B. decumbens* cv Basilisk, a porcentagem de identidade foi maior com *C. maximensis* Theis. Esta espécie foi descrita ocorrendo em *P. maximum* em Porto Rico (Theis, 1952) e posteriormente foi registrado em outros países (Lennae, 1990). No Brasil, a caracterização de *C. africana*, bem como da espécie que ocorre em gramíneas forrageiras é realizada por meio da morfologia da fase assexuada, visto que ainda não foi observada a formação da fase sexuada. Provavelmente, esta fase é influenciada por condições climáticas específicas, que não ocorrem no Brasil. Assim, os resultados observados nesse trabalho confirmaram a etiologia do patógeno do sorgo, diferenciando-o das espécies que ocorrem em outras gramíneas e sua distribuição sob diferentes condições climáticas.

Literatura Citada

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. E LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402. 1997.

- BANDYOPADHYAY, R.; FREDERICKSON, D. E.; MCLAREN, N.; ODVODY, G. N. & RYTEY, M. J. Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. **Plant disease** v.82, n. 4, p. 356-367. 1998.
- BOGO, A.; BOFF, P. Ocorrência da doença-açucarada (*Claviceps africana*) na cultura do sorgo-forrageiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v. 22, n. 3, p. 450. 1997.
- FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Ocorrência de *Claviceps sorghi*, agente causal da doença ergot no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v.20, p.302. 1995.
- FREDERICKSON, D. E. & MANTLE, P. G. The path of infection of sorghum by *Claviceps sorghi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v.33, p. 221-234. 1988.
- FREDERICKSON, D. E.; MANTLE P. G.; MILLIANO, W. A. J. DE. Secondary conidiation of *Sphacelia sorghi* on sorghum, a novel factor in the epidemiology of ergot disease. **Mycological Research** v. 93, n.4, p. 497-502. 1989.
- FREDERICKSON, D. E.; MANTLE, P. G.; MILLIANO, W. A. J. DE. *Claviceps africana* sp. nov.; the distinctive ergot pathogen of sorghum in Africa. **Mycological Research** v. 95, n.9, p.1101-1107. 1991.
- KULKARNI, B. G. P., SESHADRI, V. S.; HEGDE, R. K. The perfect stage of *Sphacelia sorghi* McRae. **Mysore Journal Agricultural Science** v.1, n.2, p. 286-289. 1976.
- LEE, S.B.; TAYLOR, J. W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M.A., Gelland, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (ed). **PCR Protocols**. London, Academic Press. c.34, p.282-287. 1990.
- LENNAE, J.M. World List of Fungal Diseases of Tropical Pasture Species. **Phytopathology Papers**. v.31, p.1-162. 1990.
- LOVELESS, A.R. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. **Transaction British Mycological Society** v.47, n.2, p. 205-213. 1964.
- MUGHOGHO, L. K. Ergot. In.: Frederiksen, R. A. (ed.) **Compendium of sorghum disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society. p.39-40. 1986.
- NOGUEIRA, S. R.. **Caracterização morfológica e germinação *in vitro* de conídios de *Sphacelia sorghi* McRae, agente causal da doença açucarada do sorgo**. *Dissertação de Mestrado UFLA - Lavras/MG*. Ms1998.
- PAZOUTOVÁ, S. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. **Mycological Research** v.105, n.3, p. 275-283. 2001.
- PAZOUTOVÁ, S.; KOLARÍK, M.; KOLÍNSKÁ, R. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. **Mycological Research** 108:126-135. 2004.
- PAZOUTOVÁ, S.; BANDYOPADHYAY, R.; FREDERICKSON, D. E.; MANTLE, P. G. & FREDERIKSEN, R. A. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease** v.84, p. 437-442. 2000.
- REIS, E. M., MANTLE, P.G. & HASSAN, H.A.G., First report in the Americas of sorghum ergot disease, caused by a pathogen diagnosed as *Claviceps africana*. **Plant Disease** v.80, n.4, p.463.1996.
- THEIS, T. An undescribed species of ergot on *Panicum maximum* Jacq. Var. common guinea. **Mycologia** v. 44, p.789-794. 1952
- THOMPSON, J.D.; DIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680. 1994.

TSUKIBOSHI, T.; SHIMANUKI, T. & UEMATSU, T. *Claviceps sorghicola* sp. nov., a destructive ergot pathogen of sorghum in Japan. **Mycological Research**. v.103, n.11, p.1403-1408. 1999.

Tabela 1. Hospedeira e origem geográfica dos isolados de *Claviceps* spp.

Isolado	Hospedeira	Origem geográfica
Ca01*	<i>Sorghum bicolor</i>	Lavras - MG
Ca03	<i>S. bicolor</i>	Lavras - MG
Ca08	<i>S. bicolor</i>	Lages - SC
Ca10*	<i>Panicum maximum</i> cv. Colorado	Sete Lagoas - MG
Ca11*	<i>S. verticilliflorum</i>	Sete Lagoas - MG
Ca17*	<i>S. bicolor</i> BE001	Sete Lagoas - MG
Ca18*	<i>S. bicolor</i>	Sete Lagoas - MG
Ca19*	<i>S. bicolor</i> BE706	Sete Lagoas - MG
Ca20*	<i>S. bicolor</i>	Sete Lagoas - MG
Ca21*	<i>S. bicolor</i>	Sete Lagoas - MG
Ca22	<i>S. bicolor</i>	Jaraguá - SP
Ca26*	<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk	Sete Lagoas - MG
Ca27*	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	Sete Lagoas - MG
Ca29	<i>S. bicolor</i>	Monte Carlo - MG
Ca32	<i>B. decumbens</i>	Uberlândia - MG

* Isolado selecionado para as análises moleculares



Figura 1. Macroconídios de *Claviceps* retirados diretamente da planta. A - hospedeira: *S. bicolor*, B - hospedeira: *F. maximum*, C - hospedeira: *Brachiaria*

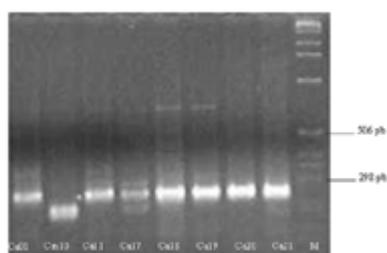


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR da região ITS do rDNA dos isolados de *Claviceps*: Ca01, Ca 11, Ca17, Ca18, Ca19, Ca20 e Ca21 - isolado de sorgo, Ca10 - isolado de *P. maximum*, M - marcador kb ladder

