

Método de Isolamento e Cultivo do Gênero *Claviceps*, Agente Causal da Doença -Açucarada de Sorgo e de Outras Gramíneas

[Previous](#) [Top](#)
[Next](#)



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

IVANILDO E. MARRIEL¹, MARCELA T. BORGES², GISELE G. MONTEIRO²,
MIRIAM K. UTIDA³, ZULEIDE M. CHAVES⁴, CARLOS R. CASELA¹ e
ALEXANDRE S. FERREIRA¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG; ²Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG; ³UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; ⁴DFP/UFLA, CP 37, 37200-000, Lavras, MG; E-mail: imarriel@cnpmis.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O sorgo é o quinto cereal mais importante no mundo, como alimento humano e animal. No Brasil, a cultura mostra grande potencial de produção em razão de sua ampla adaptabilidade a estresses abióticos, práticas agrícolas e maquinarias comuns a outras culturas. Nos últimos anos, área plantada com sorgo tem apresentando acentuado crescimento, atingindo uma produção de 2,0 milhões t na safra 2003/2004, e contribuindo para a sustentabilidade da oferta de grãos na cadeia do agronegócio, como ingrediente de ração animal.

Entretanto, sob condições de clima favoráveis, a produção de sorgo pode ser afetada pela chamada doença-açucarada ou ergot, dentre outras. Essa doença foi constatada pela primeira vez no País, em 1995 (Ferreira & Casela, 1995). A forma anamórfica de seu agente etiológico foi classificado como *Sphacelia sorghi* e a forma teleomórfica como *Claviceps*. Em 1996, a forma teleomórfica foi reclassificada como *Claviceps africana* (Reis et al., 1996). O gênero *Claviceps* pertence à família Clavicipitaceae, tribo Clavicipiteae. Pazoutová (2001) comenta a distribuição de 45 espécies de *Claviceps* a redor do mundo, as quais apresentam crescimento epifítico e endofítico. Esse autor sugere ainda que, com base em estudos filogenéticos e coevolutivos, esse gênero teve origem na América do Sul. Os membros desse gênero são parasitas especializados de gramíneas, que infectam especificamente as flores individuais da panícula, causando baixo desenvolvimento ou impedindo o desenvolvimento de grãos. Em vários casos, pode ocorrer a perda completa da cultura. Portanto, quando se utilizam linhagens com macho-esterilidade citoplasmática susceptíveis como fêmeas parentais, a doença torna-se crucial na produção de sementes híbridas. Os resultados disponíveis indicam certo grau de especificidade fungo-hospedeiro (Pazoutová et al., 2002; Pazoutová et al., 2004).

Pesquisas visando o seu controle com a aplicação de produtos químicos apresentaram resultados satisfatórios para o manejo da doença (Pinto et al., 2003). Não obstante esse sucesso, as tentativas de obtenção de cultura pura do agente causal conforme preconizado na literatura, apresentava elevado grau de insucesso, principalmente, devido a ocorrência sistemática de um fungo contaminante no exsudado, que possui uma fase leveduriforme, com uma colônia marrom-púrpura, além de outros fungos que geralmente colonizam a gota. Estes fatos impediram a formação de um banco de isolados desse fungo pela equipe de fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo e outras Instituições de Ensino e de Pesquisa. A existência de uma coleção *ex-situ* torna-se importante para o conhecimento dos aspectos ecológicos, epidemiológicos, bem como dos aspectos genéticos de fungos do gênero *Claviceps* no Brasil.

OBJETIVOS

Neste trabalho, procurou-se desenvolver uma metodologia que facilitasse o isolamento e cultivo de fungos do gênero *Claviceps*, visando o estabelecimento de uma coleção *ex-situ* fungos deste patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Fontes de macroconídios:

Utilizaram-se gotas, em diferentes estágios de exsudação, coletadas em panículas de sorgo e de capim colonião, crescidas em áreas experimentais da Embrapa milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Na maioria dos casos, uma gota foi suspensa em 200 µl de solução salina, 0,85% e diluída. Uma alíquota de 0,1 ml dessa suspensão foi transferida e espalhada nas placas contendo os respectivos meios de cultura em teste.

Método clássico de isolamento:

Após a transferência do material da gota para placa, através de estrias sobre o meio sólido, efetuava-se o monitoramento diário da placa sob microscopia ou lupa, para visualização e transferência de pedaços de ágar com conídios viáveis, e livres de levedura, para novo meio. Essas operações de subculturas eram repetidas quantas vezes necessárias, até se obter o crescimento micelial e a colônia do fungo, o que pode ocorrer em torno de duas semanas.

Diversidade metabólica da levedura

Na tentativa de limitar o crescimento do contaminante leveduriforme presente no exsudado da gota, avaliou-se sua capacidade metabólica, através do sistema Biolog, para identificar fontes de carbono não metabolizada por esse fungo. Alíquotas de 120 µl de uma suspensão de leveduras, contendo aproximadamente 10⁶ UFC /ml, foram distribuídas em EcoMicroplate e incubadas durante 48 horas. Após esse período, foram identificadas as fontes não utilizadas por esse fungo.

Germinação de macroconídios de sorgo em meios de cultura

Seis meios de cultura (MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC6), incluindo dois elaborados com as fontes de carbono selecionadas a partir da diversidade metabólica, tween 80 e D-málico, foram utilizados para avaliar a influência do meio de cultura sobre a germinação e crescimento de *Claviceps* de sorgo, em detrimento do fungo leveduriforme.

Crescimento de leveduras na presença de diferentes antibióticos

Os antibióticos estreptomicina, ampicilina, clorafenicol, gentamicina e tetraciclina e nistatina foram adicionados ao meio de cultura BDA e testados como inibidores do crescimento da fase leveduriforme do contaminante presente no exsudado da gota. As suspensões dos antibióticos foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio autoclavados. Alíquotas de 0,1 ml de diluições seriadas decimais de uma suspensão de levedura foram transferidas e espalhadas nas placas. Após 48 horas, efetuou-se a contagem de colônias.

Crescimento micelial de Claviceps diferentes meios de cultura

Para otimizar o crescimento micelial de um isolado de *Claviceps* de sorgo, foram testados 10 meios de cultura (MIC1, MIC2, MIC3, MIC4, MIC5, MIC6, MIC7, MIC8, MIC9 e MIC10). Discos de aproximadamente 4 mm foram transferidos para o centro das placas contendo cada meio, com três repetições. Após seis dias de crescimento, à temperatura ambiente, avaliou-se o diâmetro das colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares, utilizando-se do método clássico, visando o isolamento de *Claviceps* a partir de exsudados de panícula, ergot, em sorgo, utilizando-se os meios Kirkoff e BDA, mostraram crescimento microbiano nos dois meios testados. Especialmente no meio Kirkoff, observou-se a presença de um microrganismo, colônia marrom-púrpura, produção de expolímero, tipo exsudação, porém diferente do que se observa a partir do crescimento de algumas bactérias. E os exames, sob microscopia óptica e de contraste de fase, mostraram que se tratava de um fungo com fase leveduriforme, provavelmente do gênero *Aureobasidium* (Figura 1). Na etapa inicial do trabalho, a presença frequente desse contaminante gerou confusão, sendo confundido com o agente causal da doença. Na verdade, este fungo difere totalmente de fungos do gênero *Claviceps* que apresentam colônias brancas (Figura 2).

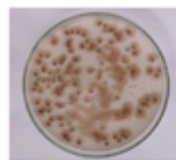


Figura 1. Aspecto morfológico de um fungo leveduriforme contaminante em exsudado de ergot

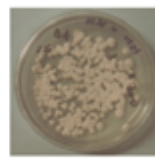


Figura 2. Aspecto morfológico de *Claviceps* em meio BDA, mostrando colônias brancas

Na tentativa de limitar o crescimento dessa fase leveduriforme, foi avaliada a sua capacidade metabólica, através de EcoMicroplate Biolog, para identificar fontes de carbono não metabolizada por esse fungo. Os resultados mostraram baixa utilização de 12 das 32 fontes testadas, inclusive Tween 80 e D- málico. Numa etapa seguinte, foram obtidos resultados da influência de seis meios sobre a germinação de macroconídios de sorgo e crescimento micelial, incluindo as duas fontes selecionadas, visando meios de culturas que favorecesse o crescimento de *Claviceps* em detrimento da levedura. Os resultados mostraram valores para germinação variando de 0 a 81%, e ausência de leveduras nos meios testados. Entretanto, as colônias de *Claviceps* também apresentaram desenvolvimento micelial limitado em alguns dos meios testados, como no tween 80 e D- málico. Por outro lado, no meio BDA houve elevada germinação, 81%, mas também ocorreu desenvolvimento de leveduras que impediram a obtenção de colônias puras de *Claviceps*.

A partir dessas observações, efetuaram-se testes com diferentes antibióticos e diferentes concentrações, visando inibir o crescimento desses microrganismos contaminantes. Em contraste aos demais antibióticos que apresentaram efeitos negligenciáveis, com a inclusão de gentamicina e tetraciclina, separadamente, observou-se uma redução acentuada do número de colônias de leveduras nas placas. E quando se utilizou a mistura dos dois antibióticos, notou-se eficiência ainda maior no controle do crescimento desse contaminante. Outro aspecto interessante que resultou do uso desses antibióticos foi a eliminação da necessidade da série de subculturas, que além de laboriosas, não raramente, propiciam a contaminação das placas. Nesse caso, necessita-se de apenas uma transferência de colônias para novo meio, após 4 a 8 dias, dependendo da espécie do patógeno. Os isolados de colônias apresentam maior taxa de crescimento, em relação ao de sorgo. Vale salientar que a inclusão desses antibióticos e a determinação de suas respectivas concentrações a serem adicionadas ao meio de cultura constituiu na etapa chave para o sucesso dos isolamentos efetuados, a posteriori. Ao contrário da estratégia inicial, a viabilidade dessa nova metodologia tem sido validada em um estudo, em andamento, visando conhecer a distribuição ecológica, características moleculares e afiliação taxonômicas de isolados de diferentes espécies de gramíneas. Em relação ao crescimento micelial de *Claviceps* de sorgo, os resultados da comparação de 10 meios, visando otimizar sua taxa de crescimento, estão apresentados na Figura 3.

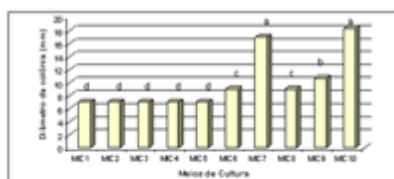


Figura 3. Crescimento de fungo do gênero *Claviceps* de sorgo em diferentes meios de cultura.

Observaram-se diferenças significativas para crescimento micelial entre os diferentes meios avaliados, com maior expansão das colônias após seis dias de crescimento, nos meios MIC 7 e MIC 10 (BDA enriquecido, com antibióticos) e menor taxa de crescimento nos meios MIC 1, 2, 3, e 4. Resultados similares foram observados quando foram comparados quatro meios para o acúmulo de massa micelial em meio líquido, com a inclusão de fonte nitrogenada, 1g/l de NH₄Cl. O meio MIC 10 apresentou maior massa micelial.

Observaram-se diferenças significativas para crescimento micelial entre os diferentes meios avaliados, com maior expansão das colônias após seis dias de crescimento, nos meios MIC 7 e MIC 10 (BDA enriquecido, com antibióticos) e menor taxa de crescimento nos meios MIC 1, 2, 3, e 4. Resultados similares foram observados quando foram comparados quatro meios para o acúmulo de massa micelial em meio líquido, com a inclusão de fonte nitrogenada, 1g/l de NH₄Cl. O meio MIC 10 apresentou maior massa micelial.

CONCLUSÃO

O plaqueamento de uma suspensão diluída do exsudado de ergot meio de cultura proposto (MIC), BDA enriquecido, contendo os antibióticos gentamicina e tetraciclina, possibilita o isolamento de *Claviceps*, independente da etapa de subculturas, com alta probabilidade de sucesso, bem como a obtenção de culturas puras em menor período de tempo, em comparação com a estratégia anteriormente utilizada.

LITERATURA CITADA

FERREIRA, A. S. & CASELA, C. R., 1995. Ocorrência de *Claviceps sorghi*, agente causal da doença ergot no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 20(Supl.): 302.

- PAZOUTOVÁ, S. 2001. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. Mycological Research 105(3): 275-283.
- PAZOUTOVÁ, S. Heteropogon triticeus, a New Host of *Claviceps sorghi* in India. 2001. J. Phytopathology, 150:1-4.2002
- PAZOUTOVÁ, S. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. Mycological Research 108:126-135. 2004.
- PINTO, N. F. J. Controle químico da ergot (*Claviceps africana* Frederckson Mantle & de Milliano) ou doença-açucarada e das principais doenças foliares do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Ciênc. Agrotec., 27(4):936-944. 2003.
- REIS, E. M., MANTLE, P.G. & HASSAN, H.A.G., 1996. First report in the Americas of sorghum ergot disease, caused by a pathogen diagnosed as *Claviceps africana*. Plant Disease 80(4): 463. (abstract).



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