

**ESPÉCIES DE *Claviceps* EM SORGO E
OUTRAS GRAMÍNEAS
FORRAGEIRAS: CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA, MOLECULAR E
PATOGENICA DE SUA FASE
ANAMÓRFICA (*Sphacelia* spp.)**

ZULEIDE MARTINS CHAVES

2006

ZULEIDE MARTINS CHAVES

**ESPÉCIES DE *Claviceps* EM SORGO E OUTRAS
GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS: CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE SUA
FASE ANAMÓRFICA (*Sphacelia* spp.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia-Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. PhD. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da UFLA

Chaves, Zuleide Martins

Espécies de *Claviceps* em sorgo e outras gramíneas forrageiras: caracterização fenotípica, molecular e patogênica de sua fase anamórfica (*Sphacelia* spp.) / Zuleide Martins Chaves. -- Lavras : UFLA, 2006.

108p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Claviceps*. 2. *Sphacelia*. 3. Mela do sorgo. 4. Ergot. 5. Gramíneas forrageiras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.202

-633.174

ZULEIDE MARTINS CHAVES

**ESPÉCIES DE *Claviceps* EM SORGO E OUTRAS
GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS: CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE SUA
FASE ANAMÓRFICA (*Sphacelia* spp.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de
Doutorado em Agronomia-Fitopatologia, para
obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 06 de março de 2006

Carlos Roberto Casela EMBRAPA Milho e Sorgo

Eduardo Alves DFP/UFLA

Mário Lúcio Vilela de Resende DFP/UFLA

José Carmine Dianese DFP/UnB



Prof. Ludwig Heinrich Pfennig
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**“As palavras comovem e inspiram, mas são os exemplos que arrastam os
homens às ações definitivas de suas vidas.”**

(Santo Agostinho)

A Deus, minha infinita fonte de inspiração, força e sabedoria,

DEDICO.

Aos meus pais Pedro e Olívia, exemplos de determinação, honestidade,
simplicidade e amor incondicional,
Meus irmãos e irmãs: Heloísa, Realina, Pedro, Gilberto, Márcio, Ângela e
Cleide, pela força, confiança e amizade,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu nascer num lar onde sou amada, cuidada e respeitada.

Aos meus pais Pedro e Olívia, razões de minha vida. Aos meus irmãos, irmãs, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, que sempre estiveram presentes, incentivando e apoiando meus projetos.

Ao CNPq, que concedeu bolsa de estudos e à FAPEMIG, agência a qual financiou o projeto (CBB 1552-98).

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação e amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de pós-graduação do Departamento de Fitopatologia.

À equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, em especial ao Edson Luiz Rezende, pela amizade e pela valiosa colaboração deste meu primeiro momento no laboratório.

Aos funcionários da EMBRAPA/Milho e Sorgo, em especial ao Dr. Ivanildo Evódio Marriel, do Lab. Microbiologia e Física do Solo, a Dra. Eliane A. Gomes, do Núcleo de Biologia Aplicada, e ao Dr. Casela e ao Dr. Alexandre, do Lab. Resistência a Doenças, que se dispuseram a me ajudar com muita paciência e carinho.

Às amigas Patrícia, Rita de Cássia, Dagma e Giselle pela companhia e bela amizade que nasceu.

Aos grandes amigos Barone, Marco Antônio e Marcos Freitas, vocês fizeram minha estadia em Lavras mais confortável e participaram intensamente desta importante da etapa de minha vida.

E a todos que, a sua maneira e a seu tempo, contribuíram para a realização deste projeto, deixo o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Página

| | |
|---|----|
| RESUMO GERAL..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| CAPITULO 1: ESPÉCIES DE <i>Claviceps</i> EM SORGO E OUTRAS | |
| GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 2 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 5 |
| 2.1 A cultura do sorgo | 5 |
| 2.1.1 Histórico..... | 5 |
| 2.1.2 O sorgo no Brasil..... | 6 |
| 2.1.3 Produção de sementes híbridas..... | 7 |
| 3 O gênero <i>Claviceps</i> | 9 |
| 3.1 Espécies de <i>Claviceps</i> em sorgo..... | 12 |
| 3.2 Características da mela e dos alcalóides | 15 |
| 3.4 Epidemiologia | 18 |
| 3.5 Ciclo biológico do fungo | 19 |
| 3.7 Caracterização molecular de espécies de <i>Claviceps</i> em sorgo..... | 23 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |
| CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> | |
| DA FASE ANAMÓRFICA (<i>Sphacelia</i> spp.) DE ESPÉCIES DE <i>Claviceps</i> DE | |
| SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO BRASIL..... | 32 |
| 1 RESUMO..... | 33 |
| 2 ABSTRACT..... | 34 |
| 3 INTRODUÇÃO | 35 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 Isolamento e manutenção de espécies de <i>Claviceps</i> | 38 |
| 4.1.1 Avaliação de métodos para o isolamento..... | 38 |
| 4.1.1.1 Seleção de antibióticos contra contaminantes leveduriformes | 38 |
| 4.1.1.2 Isolamento..... | 39 |
| 4.1.1.3 Eliminação de contaminantes | 39 |
| 4.1.1.4 Seleção de meios..... | 39 |
| 4.1.2 Isolamento e montagem da coleção..... | 40 |
| 4.2 Caracterização morfológica <i>in vivo</i> | 41 |
| 4.3 Caracterização morfológica <i>in vitro</i> | 42 |
| 5 RESULTADOS..... | 43 |
| 5.1 Isolamento e manutenção de espécies de <i>Claviceps</i> | 43 |
| 5.2 Caracterização morfológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de espécies de <i>Claviceps</i> | 46 |
| 6 DISCUSSÃO | 51 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 55 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR | 61 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| DE <i>Claviceps</i> spp. EM SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS | 61 |
|--|----|

| | |
|---------------|----|
| 1 RESUMO..... | 62 |
|---------------|----|

| | |
|-----------------|----|
| 2 ABSTRACT..... | 63 |
|-----------------|----|

| | |
|--------------------|----|
| 3 INTRODUÇÃO | 64 |
|--------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 66 |
|----------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 4.1 Isolamento e cultivo dos isolados..... | 66 |
|--|----|

| | |
|---------------------------|----|
| 4.2 Extração de DNA | 66 |
|---------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 4.3 Amplificação da região ITS 1 por PCR..... | 67 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 4.4 Seqüenciamento e análise da região ITS 1..... | 68 |
|---|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| 4.5 Análise filogenética | 69 |
|--------------------------------|----|

| | |
|-------------------|----|
| 5 RESULTADOS..... | 71 |
|-------------------|----|

| | |
|-------------------|----|
| 6 DISCUSSÃO | 77 |
|-------------------|----|

| | |
|-------------------|----|
| 7 CONCLUSÕES..... | 82 |
|-------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 4: PATOGENICIDADE DA FASE ANAMÓRFICA (<i>Sphacelia</i> spp.) DE ESPÉCIES DE <i>Claviceps</i> EM SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO BRASIL | 87 |
|--|----|

| | |
|---------------|----|
| 1 RESUMO..... | 88 |
|---------------|----|

| | |
|-----------------|----|
| 2 ABSTRACT..... | 89 |
|-----------------|----|

| | |
|--------------------|----|
| 3 INTRODUÇÃO | 90 |
|--------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 93 |
|----------------------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| 4.1 Coleta dos isolados | 93 |
|-------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------|----|
| 4.2 Produção dos inóculos | 93 |
|---------------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 4.3 Inoculação | 93 |
|----------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| 4.4 Plantas testadas..... | 94 |
|---------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| 4.5 Local e época..... | 94 |
|------------------------|----|

| | |
|---------------------|----|
| 4.6 Avaliação | 95 |
|---------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| 4.7 Reisolamento..... | 95 |
|-----------------------|----|

| | |
|-------------------|----|
| 5 RESULTADOS..... | 96 |
|-------------------|----|

| | |
|-------------------|----|
| 6 DISCUSSÃO | 98 |
|-------------------|----|

| | |
|-------------------|-----|
| 7 CONCLUSÕES..... | 101 |
|-------------------|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 105 |
|---------------------------|-----|

| | |
|-------------|-----|
| ANEXOS..... | 106 |
|-------------|-----|

RESUMO GERAL

CHAVES, Zuleide Martins. Espécies de *Claviceps* em sorgo e outras gramíneas forrageiras: caracterização fenotípica, molecular e patogênica de sua fase anamórfica (*Sphacelia* spp.). 2006, 108 p., Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras MG. ¹

A cultura do sorgo é afetada por uma doença chamada “mela do sorgo” ou “doença açucarada”, causada por espécies de *Claviceps*, que oferece sério problema na produção de sementes e no processamento desta cultura. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer um método que permita o isolamento de *Claviceps*; realizar a caracterização morfológica *in vivo* e *in vitro* de material proveniente de sorgo e outras gramíneas forrageiras; caracterizar espécies de *Claviceps* de sorgo e outras gramíneas forrageiras no Brasil usando seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA, e estudar a patogenicidade de *Claviceps* spp. por meio de inoculações cruzadas de isolados de diferentes hospedeiras. Inflorescências de sorgo, *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *Panicum maximum* com sintomas de mela foram coletadas em diferentes municípios de Minas Gerais. Foram testados 10 meios de cultura contendo diferentes antibióticos. Os isolados foram caracterizados quanto ao crescimento em meio de cultura, à morfologia dos esporos assexuados e por análise de seqüências parciais da região ITS 1 do rDNA. Nas inoculações cruzadas, *Claviceps* obtido de sorgo foi inoculado nas gramíneas forrageiras *Andropogon gayanus*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *P. atratum* cv. Pojuca, *P. maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* cv. Tanzânia, *Pennisetum glaucum* e em sorgo. A utilização de gentamicina e tetraciclina em meio específico permitiu eliminar o principal contaminante *Aureobasidium pullulans* e obter culturas puras. Foram verificadas diferenças nos macroconídios e características das colônias provenientes das diferentes hospedeiras. A comparação de seqüências amplificadas em isolados do Brasil com outras disponíveis no Genbank, bem como análises filogenéticas, evidenciaram que ocorrem, no mínimo, duas espécies distintas nas forrageiras estudadas. Com base em marcadores morfológicos e moleculares, a espécie associada ao sorgo foi identificada como *C. africana*. Os isolados obtidos das demais gramíneas forrageiras foram identificados como *C. maximensis*. As avaliações das inoculações cruzadas sustentaram esses resultados, visto que o patógeno presente nas gramíneas forrageiras não induziu sintomas da doença em plantas de sorgo, e *C. africana* não induziu a produção de sintomas nas forrageiras testadas.

¹ Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Orientador), Carlos R. Casela – EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-orientador)

ABSTRACT

CHAVES, Zuleide Martins. Species of *Claviceps* in sorghum and other forage grasses: phenotypic, molecular and pathogenic characterization of its anamorphic phase (*Sphacelia* spp). 2006, 108 p. Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology). Federal University of Lavras, Lavras, MG.²

Sugary disease, caused by species of *Claviceps*, represents a serious threat in seed sorghum production fields. The objectives of this work were to establish a method that allows isolation of *Claviceps*; to perform the morphological characterization *in vivo* and *in vitro* from material originated from sorghum and other forages; to characterize isolates by sequencing of the ITS region of the rDNA; and to study the pathogenicity of *Claviceps* spp. by cross inoculation of isolates from different hosts. Inflorescence from sorghum, *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* and *Panicum maximum* with symptoms of ergot were sampled in different cities of the state of Minas Gerais. Ten different culture media added with different antibiotics were tested. The isolates of each region were characterized for asexual spore morphology and fungal growth in the set media. For each isolate, the partial sequence of the rDNA ITS 1 region was analyzed. In the cross inoculations, *Claviceps* obtained from sorghum was inoculated in forage grasses *Andropogon gayanus*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *P. atratum* cv. Pojuca, *P. maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* cv. Tanzânia, *Pennisetum americanum* (millet), and sorghum. The utilization of gentamicin and tetracyclin on specific medium allowed to eliminate the main contaminant *Aureobasidium pullulans* and to obtain pure cultures. Differences in microconidia and colony characteristics originated from different hosts were observed. The comparison of amplified sequences of isolates from Brazil with other available in Genbank, as well as phylogenetic analysis evidenced that, at least, two distinct species of the genus *Claviceps* cause disease in the studied forages. Based on the morphological and molecular markers, the species associated to sorghum was identified as *C. africana*. The isolates obtained from other forage grasses were identified as *C. maximensis*. The evaluation of two cross inoculations support these results, considering that the pathogen present in grasses forages did not develop symptoms in sorghum plants, and *C. africana* did not induce symptoms in the tested forages.

² Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Adviser), Carlos R. Casela - EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-Adviser)

CAPITULO 1

**ESPÉCIES DE *Claviceps* EM SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS
FORRAGEIRAS**

1 INTRODUÇÃO GERAL

A doença açucarada do sorgo, também conhecida como “mela do sorgo” ou “ergot”, foi relatada na Índia em 1915, onde chegou a causar perdas de 10 a 80% em campos de produção de sementes.

Além de perdas significativas do rendimento associadas à doença, também ocorrem perdas indiretas. A mela produzida em floretes infectados pode entupir ou estragar os equipamentos utilizados na colheita. A contaminação pelo patógeno reduz a qualidade da semente e limita seu uso como ração. As perdas causadas pela doença à produção da semente no Brasil foram estimadas em R\$ 3 milhões em 1995 (Bandyopadhyay et al., 1996). Na Austrália, verificou-se um aumento dos custos associados ao controle da doença em áreas da produção de semente de até R\$ 18,00 por saco de 25 kg de semente, o que representa um custo líquido anual de R\$ 4 milhões para a indústria (Bandyopadhyay et al., 1998).

Até a década de 1990, a doença estava restrita aos continentes africano e asiático, sobretudo na Índia (Bandyopadhyay et al., 1998). Em meados de 1995, foi relatada em lavouras comerciais de sorgo forrageiro e de produção de sementes híbridas no Brasil, com alta incidência e severidade nos municípios de Lavras, Sete Lagoas e Capinópolis (MG), Cravinhos (SP), Jacarezinho e Arapoti (PR) (Casela et al., 1997). A doença foi também observada em outras forrageiras como *Panicum maximum* (Jacq.) cv. Colonião e espécies de *Andropogon* e *Brachiaria*, principalmente próximo às lavouras de sorgo afetadas pelo fungo (Ferreira & Casela, 1995).

Em 1996, a doença foi reportada na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Colômbia, Venezuela e Honduras. Já no ano seguinte foi relatada em Porto Rico, República Dominicana, Haiti, Jamaica e México. No final de 1997

chegou aos Estados Unidos, onde causou sérios danos em áreas de produção de sementes (Bandyopadhyay et al., 1998).

O fungo infecta individualmente os floretes da panícula, de forma não sistêmica, reduzindo a produção e limitando o desenvolvimento das mesmas. Em cultivares suscetíveis, a perda da produção de sementes é em torno de 60%, podendo, em alguns casos, ser total. As perdas não ocorrem somente na quantidade de sementes, mas também na qualidade devido ao crescimento de saprófitas sobre o exsudato que recobre as panículas e na redução da viabilidade das sementes (Odvody, 1998).

No Brasil, Ferreira & Casela (1995) identificaram o agente etiológico da doença como *Claviceps sorghi* B.G.P. Kulk. Posteriormente, este fungo foi identificado como *C. africana* Freder., Mantle & De Milliano, com a fase anamórfica denominada *Sphacelia sorghi* McRae (Reis et al., 1996). A identificação foi feita com base na hospedeira, na sintomatologia da doença e nas características morfológicas do anamorfo. Porém, a identificação precisa do patógeno somente é possível com base na fase teleomórfica, o que ainda não foi observado nas condições climáticas brasileiras.

Estudos de filogenia, por meio de análise de seqüências do DNA, correlacionadas com a especificidade com as hospedeiras, indicaram o continente sul-americano como provável centro de origem de espécies do gênero *Claviceps* Tul. (Pazoutová, 2001). O primeiro relato da ocorrência do gênero em gramíneas forrageiras no Brasil data de 1901, porém os esclerócios encontrados apresentavam características consideradas primitivas e intermediárias entre os generos *Balansia* Speg. e o *Claviceps* (Pazoutová et al., 2004), ambos pertencentes à família Claviceptaceae *sensu* Eriksson (2006).

Utilizando seqüências da região ITS do rDNA para comparar isolados provenientes da Austrália, Índia, Estados Unidos, Bolívia, México e África do Sul, Pazoutová et al. (2000) sugeriram que o patógeno introduzido na Austrália

seria oriundo da Índia, e o registrado nas Américas, provavelmente proveniente da África.

A correta identificação do patógeno por meio das características morfológicas das fases anamórfica e teleomórfica, associadas às características reveladas pelo uso de técnicas moleculares, como, por exemplo, a análise de seqüências específicas do genoma, são potentes ferramentas para esclarecer a procedência das espécies de *Claviceps* e a diversidade de suas populações no Brasil, em especial da espécie que infecta sorgo. Esta identificação é de grande importância não só para os estudos das interações planta-patógeno, mas também nos programas de melhoramento visando a resistência à doença. Diante da escassez de informações sobre a identidade do patógeno da doença açucarada no Brasil e da participação das gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiras secundárias de *Claviceps*, os objetivos deste trabalho foram:

- a. estabelecer uma metodologia de isolamento de *Claviceps* em sua fase anamórfica (*Sphacelia* spp.) que ocorre em sorgo e outras gramíneas forrageiras no Brasil e formar uma coleção *ex-situ* do patógeno para estudos *in vitro*.
- b. proceder à caracterização morfológica e molecular dos isolados de *Claviceps* provenientes de sorgo e de outras gramíneas forrageiras.
- c. testar a patogenicidade da fase anamórfica (*Sphacelia* spp.) das espécies de *Claviceps* provenientes de sorgo em diferentes gramíneas forrageiras, por meio de inoculações cruzadas, a fim de verificar a ocorrência de hospedeiras alternativas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do sorgo

2.1.1 Histórico

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é o quinto cereal mais importante do mundo em produção, sendo precedido pelo trigo, arroz, milho e cevada. A espécie originou-se no quadrante noroeste da África e parte da Ásia e foi, provavelmente, domesticada na Etiópia, pela seleção a partir de espécies silvestres (*Sorghum arundinaceum* (Desv.) Stapf ou *Sorghum verticilliflorum* (Steud.) Stapf), há cerca de cinco a sete mil anos atrás. Foi difundido, por rotas de comércio, por toda a África, e do Oriente Médio à Índia, há pelo menos três mil anos, por nativos que migravam por vários países. O sorgo foi primeiramente levado para as Américas pelos comerciantes de escravos do oeste da África; introduzido nos Estados Unidos em 1857, e posteriormente, no início do século XX, atingiria a América Latina e Austrália (Santos et al., 2005).

Apesar de a cultura ser muito antiga, somente em meados do século IX o sorgo passou a ser explorado em diferentes regiões do mundo, tornando-se especialmente importante nos trópicos e subtropicais, onde era utilizado quase que exclusivamente como substituto do milho na ração animal (Pinho & Vasconcelos, 2002). Entretanto, o sorgo passou a ser uma das principais matérias-primas na alimentação humana e animal e na produção de álcool dos países da África, sul da Índia e América Central. Nos Estados Unidos, Austrália e em outros países industrializados é usado na produção de ração animal (Murty et al., 1994).

2.1.2 O sorgo no Brasil

O sorgo, embora considerado uma cultura de importância recente no Brasil, é cultivado no Nordeste desde o século XIX, trazido por escravos. Porém, a partir da segunda década do século XX até fins dos anos 60, a cultura foi introduzida de forma racional e econômica no país por meio dos institutos de pesquisa públicos e universidades. As pesquisas com o sorgo conduzidas pelo Instituto de Pesquisas Agropecuárias - IPA, de Pernambuco, em 1957 utilizaram materiais de coleções oriundas do norte da África, de Fort Collins - Colorado/Estados Unidos e do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, São Paulo. Estas coleções deram origem aos atuais cultivares forrageiros comerciais (Santos et al., 2005).

A cultura do sorgo se estabeleceu no Brasil com base nos resultados obtidos de sementes melhoradas para obter cultivares adequados às condições brasileiras (Ribas, 2000a). Uma expansão acentuada ocorreu a partir da década de 1970, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. A área cultivada deu um salto extraordinário a partir do início dos anos 90, quando o Centro-Oeste passou a ser a principal região de cultivo de sorgo granífero, enquanto o Rio Grande do Sul e Minas Gerais lideraram a produção de sorgos forrageiros (Ribas, 2000a).

O sorgo granífero é cultivado basicamente sob três sistemas de produção. No Rio Grande do Sul planta-se sorgo na primavera e colhe-se no outono. No Brasil Central a semeadura é feita em sucessão às culturas de verão, principalmente a soja. E no Nordeste planta-se na estação das chuvas, ali designada de "inverno". Mais recentemente tem sido observado o plantio de sorgo sob irrigação suplementar, tanto no Nordeste como no Centro-Oeste (Ribas, 2000a).

No segmento de sorgo forrageiro, o cultivo é exclusivamente de verão-outono, sendo a produção destinada principalmente à confecção de silagem. Mas

nos últimos anos cresceram significativamente as áreas de sorgo destinada ao pastejo e/ou ao corte verde, que também se prestam para formação de palha para plantio direto, com cultivares adaptados aos sistemas integrados de agricultura e pecuária (Ribas, 2000b).

Os grãos de sorgo são destinados, quase que exclusivamente, a avicultura e suinocultura. Bovinos, eqüinos e pequenos animais são também consumidores, mas em menor proporção. Praticamente não há consumo de sorgo em alimentação humana. A silagem de sorgo e o pastejo são igualmente utilizados para rebanhos de corte e de leite (Ribas, 2000a).

O sorgo é uma planta adaptada a suportar altas temperaturas, possibilitando seu cultivo numa ampla faixa de temperatura (18° C a 30°C). Essa característica permite que a cultura seja apta a se desenvolver e se expandir em regiões de cultivo com distribuição irregular de chuvas e em sucessão a culturas de verão (Pinho & Vasconcelos, 2002; Santos, 2000).

A produção brasileira em 2002/03 foi de 1.357 milhões de toneladas, ocupando uma área de 620 mil hectares (Agrianual, 2004).

2.1.3 Produção de sementes híbridas

Com o advento da produção de cultivares híbridos, a produção de sementes foi melhorada significativamente. A semente híbrida (F_1) é produto do cruzamento de pais geneticamente diferentes. Entretanto, a exploração comercial de um híbrido somente é possível quando as características incorporadas são economicamente importantes e o mecanismo de hereditariedade é estável e permite produção em larga escala (Murty et al., 1994).

Contudo, é essencial para o desenvolvimento de híbrido de qualidade o conhecimento prévio do comportamento dos pais envolvidos na produção da semente híbrida. É importante ajustar a data de semeadura para que o florescimento das linhagens seja simultâneo. Temperaturas baixas antecipam a

floração e podem reduzir a viabilidade do pólen durante a antese devido à interrupção da meiose durante os estádios iniciais da microesporogenese (Brooking, 1979).

A exploração comercial do sorgo tornou-se efetiva a partir de 1954, com a descoberta do sistema de macho esterilidade genético-citoplasmática, resultado da combinação do citoplasma Milo e genes Kafir (Stephens & Holland, 1954). As plantas macho-estéreis, que não produzem pólen funcional, são extremamente convenientes para produção de sementes híbridas em larga escala (Kaul, 1988).

Em sorgo são conhecidos dois tipos de macho esterilidade: a macho esterilidade genética e a macho esterilidade genético-citoplasmática (CMS – *Cytoplasmatic Male Sterility*). A macho esterilidade genética é produto de um gene recessivo simples. Entretanto, as dificuldades práticas de se obter um híbrido comercial por este sistema ocorrem devido à produção de poucas plantas disponíveis entre as populações segregantes. Já a CMS resulta de uma interação de fatores que induzem a esterilidade no citoplasma com fatores genéticos do núcleo (Murty et al., 1994). É caracterizada pela supressão da produção de pólen viável e pela herança não-mendeliana desta característica (Levings, 1990; Hanson, 1991).

Os híbridos de sorgo são produzidos pelo cruzamento entre uma linhagem macho-estéril e uma linhagem fértil polinizadora. A linhagem macho-estéril, denominada A, é produzida pela polinização de plantas macho-estéreis com pólen da linhagem denominada mantenedora (B). As sementes produzidas pelo cruzamento diferentes das linhagens A e B resultarão em plantas A (macho-estéreis), isto porque a linhagem B não restaura a fertilidade da linhagem A. As linhagens A e B são quase isogênicas, porém diferentes na fertilidade do pólen. As sementes de híbridos são produzidas pelo cruzamento entre linhagens A e uma linhagem restauradora da fertilidade, denominada R. A linhagem R não é

fenotipicamente semelhante à linhagem A, e a combinação delas deverá resultar em um híbrido de alto potencial de rendimento (House, 1985).

3 O gênero *Claviceps*

Os fungos do gênero *Claviceps* Tul. são ascomicetos com peritécios contendo ascos unitunicados imersos em um estroma, o qual é oriundo da germinação de esclerócios produzidos em floretes de gramíneas hospedeiras. A família Clavicipitaceae (gênero tipo *Claviceps*) inclui gêneros endofíticos, parasitas de insetos, de plantas e de outros fungos, entre eles: *Balansia* Speg., *Beauveria* Vuill., *Cordyceps* (Fr.) Link, *Ephelis* Fr., *Epichloë* (Fr.) Tul. & C. Tul. e *Hypocrella* Sacc. (Spatafora & Blackwell, 1993; White Jr. et al., 2003). A família possui 33 gêneros e 157 espécies (Kirk et al., 2001; Eriksson, 2006).

Claviceps purpurea (Fr.) Tul., espécie tipo do gênero, é considerada uma das mais importantes. Grãos de centeio (*Secale cereale* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) contaminados com esclerócios do fungo causaram sucessivas epidemias entre os habitantes da Europa, caracterizadas pela alta incidência de gangrena de membros inferiores e superiores, por distúrbios do sistema nervoso central e pela morte de muitas pessoas. Este flagelo, recorrente na Idade Média, foi designado “Fogo da Santo Antônio” por ocorrer em junho, no início do verão europeu, próximo ao dia do santo. Os esclerócios do fungo formados nas inflorescências do centeio assemelhavam-se a uma espora de galo, que em francês denomina-se “ergot”, termo adotado mundialmente para os esclerócios e para designar a doença (Tudzynski et al., 1995).

Até 1950, havia dúvidas quanto à correta posição taxonômica da família Clavicipitaceae. Duas escolas discordavam na ênfase dada aos caracteres morfológicos e ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas. Um grupo, com base nas características do estroma e do anamorfo, alocou a família na ordem Clavicipitales próximo a Hypocreales (Spatafora & Blackwell, 1993). O outro

grupo, analisando o desenvolvimento e a anatomia do *centrum*, acomodou os membros de Clavicipitales em Xylariales (Miller, 1949; Reynolds, 1981; Barr, 1990).

No entanto, estudos independentes, usando diferentes regiões do DNA, associados ao desenvolvimento do estroma, anatomia do *centrum* e hábitos de nutrição, não somente sustentaram a hipótese das estreitas relações entre Clavicipitales e Hypocreales como também evidenciaram fortes afinidades filogenéticas entre as duas ordens (Spatofora & Blackwell, 1993). Atualmente, a família é colocada na ordem Hypocreales (Spatofora & Blackwell, 1993; Kirk et al., 2001; Eriksson, 2006) e distingue-se morfológicamente dentro desta ordem por apresentar estroma freqüentemente colorido, o qual se desenvolve em um esclerócio dentro ou sobre o hospedeiro, ascos unitunicados cilíndricos com aparelho apical proeminente e poro estreito, e ascósporos filiformes (Tudzynski et al., 1995).

As espécies de *Claviceps* em geral parasitam inflorescências de gramíneas, porém algumas espécies ocorrem em membros das famílias Juncaceae e Cyperaceae. Os ovários, uma vez colonizados, são substituídos pelas estruturas do fungo que normalmente se desenvolve em um esclerócio (Tudzynski et al., 1995; Alderman, 2003; Pazoutová, 2003). Kirk et al. (2001) reconheceram 36 espécies, outros autores aceitam 45 espécies (Pazoutová, 2001; Alderman, 2003), porém o Index Fungorum lista, atualmente, 70 espécies (www.indexfungorum.org)

A fase teleomórfica possui características bem peculiares que são utilizadas como critérios taxonômicos para separar as espécies. São elas a coloração, o tamanho e o formato do ascostroma, o qual geralmente é claro, globoso a esférico, sustentado por uma estipe que se desenvolve a partir da germinação do esclerócio; a presença ou ausência de filamentos estéreis no peritécio; o tamanho e forma dos peritécios, que podem ser ovais a obpiriformes,

distribuídos na superfície e parcialmente incrustados no estroma, conferindo uma aparência verrugosa no ascostroma; o tamanho e forma dos ascos e dos ascósporos. Os fungos do gênero *Claviceps* formam ascos cilíndricas contendo oito ascósporos unicelulares filiformes e multiseptados, as quais geralmente se fragmentam em propágulos ainda dentro do asco (Pazoutová, 2003).

O tamanho e, até certo ponto, o formato dos esclerócios são dependentes do espaço interno disponível na cavidade floral da hospedeira (Pazoutová, 2003). O esclerócio consiste de uma massa compacta e dura de hifas e serve como estrutura de sobrevivência de *Claviceps*, na ausência da hospedeira, durante os períodos em que não há condições propícias para germinação. A germinação do esclerócio, o desenvolvimento e amadurecimento do ascostroma, para posterior liberação dos ascósporos, devem coincidir com o florescimento da planta hospedeira (Alderman, 2003).

Estudos sobre a natureza dos esclerócios, feitos por Luttrell (1977, 1981), constataram que a estrutura do fungo substitui o ovário quando o florete é infectado. A colonização tem seu início pela penetração dos tubos germinativos dos ascósporos por entre as células do estigma do hospedeiro, fazendo com que as hifas cresçam intercelularmente através do estilete até atingirem a base do ovário. As hifas se formam ao redor das células do hospedeiro. A massa de hifas, a partir da base do ovário, digere os tecidos e os substitui com o estroma do fungo. Após algum tempo, as hifas emergem entre as células epidérmicas e formam uma massa estromática que contribui para o aumento do volume do esclerócio. Na base do estroma, a hifa estende-se dentro e entre as extremidades dos feixes vasculares, digerindo os vasos, os quais estão associados às células vivas do parênquima. As hifas invadem o óvulo somente depois que as paredes do ovário estiverem destruídas.

O estágio assexuado ou o anamorfo desempenha um importante papel no ciclo de vida dos fungos clavicipitáceos. Poucos têm a fase sexual definida,

criando problemas quanto a sua identificação e classificação. Os anamorfos são classificados com base na morfologia das estruturas associadas à produção de esporos (Hodge, 2003).

Os anamorfos de fungos clavicipitáceos são claros, às vezes de cores brilhantes; produzem conídios unicelulares em cadeias secas ou gotas úmidas e têm conidiogênese tipicamente fialídica (Rykard & Luttrell, 1984; Spatafora & Blackwell, 1993; Hodge, 2003). Apresentam três diferentes tipos de vida. Em menor número de espécies estão os parasitas de insetos, depois os fitoparasitas e os micoparasitas. A maioria das espécies de *Claviceps* tem como anamorfo *Sphacelia*; entretanto, a estrutura do conidioma é altamente variável de uma espécie para outra (Luttrell, 1977; Rykard & Luttrell, 1984). Esta fase produz conídios em uma matriz pegajosa, conhecida como “mela”, rica em açúcares e bastante atrativa aos insetos, os quais são uma das principais vias de dispersão do fungo (Hodge, 2003).

3.1 Espécies de *Claviceps* em sorgo

A mela do sorgo foi relatada primeiramente por McRae em Madras/Índia, em 1915. O patógeno não apresentava uma fase sexual óbvia e formava uma frutificação esfacial associada a um exsudato açucarado (mela), sendo denominado *S. sorghi* (McRae, 1917). Posteriormente, em 1924, a mesma doença foi observada no Kênia (Bandyopadhyay et al., 1998). Kulkarni et al. (1976) descreveram a fase sexuada de *S. sorghi* como *C. sorghi*, incluindo os patógenos asiático e africano.

Em 1991 foram constatadas, nas espécies procedentes da Índia e da África, diferenças significativas nas características morfológicas do esclerócio, do estroma e da fase ascogênica; na composição dos açúcares produzidos nas panículas infectadas; na natureza química e na quantidade de alcalóides. Com base nessas observações o patógeno africano foi descrito como uma nova

espécie, *C. africana* (Frederickson et al. 1991). Os alcalóides produzidos pela espécie *C. africana* são principalmente dihidroergosina e há outros intermediários, como festuclavina, dehidroelymoclavina (Frederickson et al., 1991; Mantle, 1973), enquanto na espécie de origem indiana, *C. sorghi*, estes compostos estão ausentes (Frederickson et al., 1991). No Japão, a ocorrência de “ergot” no sorgo foi relatada na década de 1980 e o patógeno, identificado como *C. africana*. Diferenças nos sintomas da doença levaram à constatação da existência de uma nova espécie endêmica nesta região, a qual foi descrita como *C. sorghicola* Tsukiboshi, Shiman e T. Uematu, o que foi confirmado pelas diferenças na morfologia do teleomorfo, do anamorfo e na produção de alcalóides (Tsukiboshi et al., 1999).

Assim, *C. africana*, *C. sorghi* e *C. sorghicola* distinguem-se em relação à morfologia do teleomorfo (características da estipe, capítulo, ascos e ascósporos), morfologia dos esclerócios, presença de alcalóides no esclerócio e habilidade para produzir conídios secundários. A forma assexuada do fungo (*S. sorghi*), de ocorrência mais comum na natureza, pode formar três diferentes tipos de esporos assexuados, os quais estão contidos na mela: os microconídios (esféricos), os macroconídios (elípticos) e os conídios secundários (piriformes) (Tabela 1) (Pazoutová et al., 2000).

Claviceps sorghi tem sua ocorrência restrita ao subcontinente indiano, onde causou grandes problemas em áreas de produção de sementes. A fase anamórfica, identificada como *S. sorghi*, teve sua fase teleomórfica descrita em 1976 (Kulkarni et al., 1976), e posteriormente foram acrescentados maiores detalhes a esta descrição (Frederickson et al., 1991). A espécie exibe esclerócios alongados, curvos a retos, inicialmente creme a amarelo, escurecendo para cinza a marrom claro. Quando incubados em areia úmida produzem o ascostroma dentro de cinco semanas. As estipes são de coloração bronze a marrom-avermelhada, escurecendo próximo ao *capitulum*, e brancas na base. Os *capitula*

são amarelos com 0,7 mm de diâmetro e com um colar branco na base. Apresentam peritécios com 130-250 x 60-125 μm , ascos de 56-114 x 2,4-3,2 μm e ascósporos de 40-97 x 0,4-0,8 μm . Na fase anamórfica os macroconídios são oblongos a ovais, levemente constrictos na região mediana e com dimensões de 8-19 x 4-6 μm . Os microconídios são esféricos, com 2,5 μm de diâmetro. Não foi detectado nenhum tipo de alcalóide nos esclerócios (Frederickson et al., 1991).

Claviceps africana forma macroconídios na superfície do exsudato com capacidade de germinar e produzir um conidióforo sobre o qual são formados conídios secundários. Estes conídios secundários são formados logo após o início da produção da mela, sendo que temperaturas entre 14-28°C, umidade relativa acima de 90% e fotoperíodo de 12-16 h/dia favorecem o desenvolvimento da doença (Bandyopadhyay et al., 1990). Os esclerócios são ovais a esféricos, com partes do córtex marrom avermelhado cobertas por frutificação esfacial branca. Em areia úmida até 20-25°C, os esclerócios germinam após um período de quatro semanas e amadurecem após cerca de seis semanas. As estipes são glabras, inicialmente translúcidas, tornando-se púrpura. Os *capitula* são subglobosos, púrpura escuros, com 0,5-13 mm de diâmetro. Apresentam peritécios aparefisados com 86-135 x 123-226 μm , ascos com 140 x 3,2-4,2 μm e ascósporos até 45 x 0,8-12 μm . Na fase anamórfica os macroconídios são oblongos a ovais, levemente constrictos na região mediana e com dimensões de 9-17 x 5-8 μm . Os microconídios são esféricos, com 2-3 μm de diâmetro. Os macroconídios germinam, dando origem a conídios secundários piriformes, com 8-14 x 4-6,5 μm (Frederickson et al., 1991).

Claviceps sorghicola, a espécie que ocorre no Japão, difere das demais por terem macroconídios menores, pela ausência de microconídios e de conídios secundários e pela produção de substâncias similares a alcalóides tricíclicos, como a paliclavina. Os esclerócios são cônicos a cilíndricos, retos a curvados,

púrpura-escuros a pretos, com 2,5-20 x 1,9-3,5 mm. As estipes são marrons a bronzes. Os *capitula* são globosos a subglobosos, marrom-escuros, com 0,5-16 mm de diâmetro e distintamente papilados. Apresentam peritécios ovais a piriformes, com 215-300 x 105-140 μm , ascos com 122-215 x 2,5-3,8 μm e ascósporos com 92-205 x 0,5-1 μm . Na fase anamórfica os macroconídios são elipsóides a ovais, com dimensões de 5-11,3 x 2,5-3,8 μm (Tsukiboshi et al., 1999).

3.2 Características da mela e dos alcalóides

A secreção formada durante o processo de infecção, pelas três espécies de *Claviceps* em sorgo, é um exsudato viscoso contendo alta concentração de açúcares higroscópicos em sua composição, o qual interfere na epidemiologia da doença de três formas: (1) o fluxo da solução de açúcares ajuda na translocação dos conídios do ponto em que são formados até a parte externa da inflorescência da hospedeira; (2) o exsudato é atrativo aos insetos e, por ser pegajoso, adere às suas patas, facilitando a disseminação dos conídios. Moscas e besouros são agentes de dispersão da mela para plantas sadias; e (3) a matriz açucarada preserva os conídios em condições de tempo quente e seco (Mower & Hancock, 1975b).

Campbell (1959) sugeriu que a produção do exsudato e a posterior indução da doença se dão por enzimas do hospedeiro. Alguns dos açúcares produzidos na mela de *Sphacelia* são encontrados somente em meio de cultura e outros, somente no exsudato produzido pelos hospedeiros. Isso indica que para sintetizar certos açúcares seria necessária a atividade de enzimas específicas que só ocorrem em condições naturais (Mower & Hancock, 1975a). Os tipos de açúcares que ocorrem na mela são hexoses, alditóis, frutofuranosilglucoses e frutofuranosilalditóis. Glicose e frutose são os que predominam. Na área de

infecção, o açúcar carregado para a cavidade floral em maior quantidade parece ser a sacarose (Mower & Hancock, 1975a).

Mower & Hancock (1975b) consideraram que a composição da mela e os diferentes tipos de açúcares produzidos por cada espécie poderiam servir como um critério taxonômico para separação de subgrupos de *Sphacelia*. Após o desenvolvimento do estroma dentro da cavidade floral ocorrem alterações fisiológicas na planta hospedeira que conduzem à formação do esclerócio (Mower & Hancock, 1975b), o qual desempenha uma função de grande importância para a sobrevivência do patógeno. Além disso, é uma fonte de substâncias ativas de uso farmacêutico, oriundas de metabólitos secundários produzidos pelo fungo, dentre elas os alcalóides (Kittakoop et al., 2003).

Historicamente, *C. purpurea* tem sido a espécie mais estudada principalmente pelo fato de produzir ácido lisérgico (LSD), um potente alcalóide com propriedades alucinógenas (White Jr. et al., 2003). Em *C. africana*, o principal alcalóide presente nos esclerócios foi identificado como dihidroergosina, sendo também detectados teores de festuclavina, dihidroelinoclavina e canoclavina em porcentagens que variam de 0,2 a 0,5 %. Tanto o esclerócio como o exsudato açucarado não foram tóxicos a animais, que podem, portanto, ser alimentados com sorgo forrageiro infectado pelo patógeno (Frederickson & Mantle, 1988). Na Austrália, em estudos de toxicidade dos alcalóides produzidos pelo fungo não foram observados efeitos tóxicos em suínos, aves e gado leiteiro alimentados com sementes contaminadas com 1% de esclerócios de *C. africana* (Ryley et al., 2002). No Brasil, os problemas com toxicidade de alcalóides são desconhecidos ou menores do que os relatados para os cereais de inverno (Reis et al., 2000).

TABELA 1. Comparações morfológicas e bioquímica de *C. africana*, *C. sorghi* e *C. sorghicola*.*

| | <i>C. africana</i> | <i>C. sorghi</i> | <i>C. sorghicola</i> |
|--------------------|--|--|---|
| Esclerócios | | | |
| Forma | Oval a esférico | Longo, cilíndrico, curvado a reto | Cilíndrico ou cônico curvado ou reto |
| Textura | Compacta | Frouxa ou compacta | Compacta |
| Tamanho | 4-6 x 2-3 mm | 3-14 x 1-2,5 mm | 2,5-20 x 1,9-3,5 mm |
| Cor | Marrom avermelhado, tecido esfacelial branco | Cinza a marrom claro | Preto-purpúreo a preto, tecido esfacelial branco |
| Ascostromas | | | |
| Estipes | Púrpura, 8-15 x 0,3-0,6 mm | Bronze a marrom avermelhado, 6-8 x 0,5 mm | Bronze a marrom, 3,5-17 mm |
| <i>Capitula</i> | Subgloboso, púrpura escuro, 0,5-1,3 mm diâmetro, papila distinta | Globoso, amarelo escuro, 0,7 mm diâmetro, pouco papilado | Globoso a subgloboso, marrom escuro, 0,5-1,6 mm diâmetro, papila distinta |
| Peritécios | Oval a obpiriforme 123-226 x 86-135 μm | Oval a obpiriforme 130-250 x 60-125 μm | Oval a obpiriforme 215-300 x 105-140 μm |
| Ascospores | 140 x 3,2-4,2 μm | 56-114 x 2,4-3,2 μm | 122-215 x 2,5-3,8 μm |
| Ascósporos | até 45 x 0,8-1,2 μm | 40-97 x 0,4-0,8 μm | 92-205 x 0,5-1 μm |
| Anamorfo | | | |
| Conídios | Hialinos, macroconídios: oblongo a oval, 9-17 x 5-8 μm , microconídios: 2-3 μm | Hialinos, macroconídios: oblongo a oval, 8-19 x 4-6 μm , microconídios: 2,5 μm | Hialinos, macroconídios: elipsóide a oval, 5-11,3 x 2,5-3,8 μm , |
| Bioquímica | | | |
| Alcalóides | Principalmente dihidroergosina, e outros intermediários | Não produz | Semelhante a alcalóides tricíclicos a paliclavina |

* dados de Tsukiboshi et al. 1999.

3.3 Sintomatologia

Os primeiros sintomas da doença em sorgo podem ser observados em ovários das glumas fechadas, e três a cinco dias após a infecção. O ovário infectado apresenta-se enrugado, com uma coloração verde opaca a cinza, em contraste com o verde-escuro e arredondado de um ovário sadio e fertilizado. Com a evolução da infecção, a base do ovário é substituída por uma estrutura pseudoestromática. Com dois dias o micélio branco, na base do ovário, estende-se gradualmente para cima. O ovário é convertido em estroma do fungo com dobras tênues (Bandyopadhyay et al., 1998).

Externamente, os sintomas evidenciam-se de 5 a 10 dias após a infecção, na forma de gotas de coloração inicialmente translúcidas, tornando-se róseas, pegajosas e adocicadas, que exsudam dos ovários infectados (Bandyopadhyay et al., 1998). Vários fungos saprófitas crescem sobre as gotas, formando uma massa negra e amorfa. Sob condições de alta temperatura e de baixa umidade há um ressecamento da exsudação, a qual se transforma em uma crosta esbranquiçada e dura; este é o início da formação dos esclerócios (Futtrell & Webster, 1966).

No Brasil, o agente etiológico da mela foi identificado como *C. africana* (Reis et al., 1996), porém ainda não foi observada a formação de esclerócios do fungo e, portanto, esta afirmativa teve como embasamento apenas a fase anamórfica, comum não somente para as três espécies de *Claviceps* que infectam sorgo como para várias outras espécies do mesmo gênero.

3.4 Epidemiologia

Durante a antese o fungo se desenvolve no ovário não fecundado, impedindo a formação de sementes ou de grãos. Vários estudos demonstraram que a polinização, seguida da fertilização, previne a doença açucarada do sorgo. Portanto, todos os fatores climáticos e biológicos que afetam a produção e o

vigor do pólen e/ou impedem a abertura normal das anteras e favorecem o desenvolvimento da doença (Frederickson & Mantle, 1988).

Futtrell & Webster (1966) sugeriram que a infecção primária no campo estaria associada a conídios de hospedeiros secundários. Os conídios presentes no exsudato seriam transportados por insetos às panículas receptivas do sorgo sadio. Os restos de panículas infectadas presentes no solo, e ainda a elevada produção de conídios no exsudato de cinco dias após a infecção do sorgo, seguramente também funcionariam como fonte de inóculo. Outra importante fonte de inóculo são os esclerócios deixados sobre o solo durante a colheita. Estes, após a germinação, dão origem a ascomas que produzem os ascósporos, facilmente disseminados pelo vento, e que podem, potencialmente, infectar plantas sadias (Kulkarni et al., 1976).

Os floretes são vulneráveis à infecção a partir da emergência da panícula, até a fertilização do ovário. Como a infecção ocorre apenas durante a floração, qualquer fator que possa afetar a infecção somente terá efeito durante essa fase. A temperatura de 19,5° C é considerada ótima para o desenvolvimento da doença. Temperaturas noturnas abaixo de 13° C durante a microesporogênese induz a macho esterilidade em sorgo e, portanto, também levam à predisposição à doença (McLaren & Wehner, 1990, McLaren, 1992).

3.5 Ciclo biológico do fungo

O ciclo biológico do fungo inicia-se quando o esporo (ascósporo ou conídio) atinge o estigma, germina, emite um tubo germinativo que cresce através do estilete e coloniza o ovário. Danos no estigma e no estilo somente podem ser observados 48 horas após a infecção. O tecido do ovário é gradualmente colonizado e, num período de 48 a 72 horas após a infecção, começa a necrose e a desintegração da parede do ovário. Com 5-7 dias, toda a região da micrópila, da calaza e do nucelo é substituída pelo micélio do fungo, o

qual forma o tecido pseudoestromático. Internamente este tecido estromático possui lóculos nos quais os conídios são produzidos sobre a superfície do estroma, ou seja, o micélio no interior do ovário produz conídios sobre conidióforos dispostos numa camada paliçádica. Cerca de 10 dias após a infecção é possível visualizar a secreção da mela na flor infectada (Figura 1) (Bandyopadhyay et al., 1990; Hernández-Martínez et al., 2001).

Os conídios são liberados dos grãos infectados, incorporados ao exsudato açucarado. Quando está seco, o exsudato torna-se branco e pulverulento. A crosta formada é altamente higroscópica, absorve a água da atmosfera, diluindo os açúcares concentrados, podendo ser hidratada pela chuva, orvalho ou água de irrigação. Em *C. africana*, os macroconídios emitem tubos germinativos que se sobressaem à superfície, agindo como conidióforos ao produzirem conídios secundários em suas extremidades, os quais são facilmente removidos e disseminados pelo vento até as flores receptivas do sorgo. Nestas condições, o patógeno pode permanecer viável por sete a oito meses, aumentando seu potencial de disseminação (Frederickson et al., 1989).

A infecção seguinte se desenvolve pela disseminação a longa distância dos conídios secundários. Vários ciclos de infecção secundários podem acontecer quando ocorre florescimento por um período prolongado.

Em um período de quatro a oito semanas após o fungo ter se estabelecido no ovário da hospedeira, o estroma do fungo transforma-se em um esclerócio maduro. O tamanho e a forma do esclerócio dependem do genótipo do hospedeiro e de fatores ambientais e nutricionais. O processo de formação do esclerócio é também influenciado por fungos contaminantes, tais como *Epicoccum* Link (= *Cerebella volkensii* (Henn.) Mundk.), *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg e *Cladosporium* spp., que crescem na mela durante o seu desenvolvimento, principalmente sob condições de alta umidade (Kulkarni et al., 1976; Sangitrao & Bade, 1979). No entanto, sob condições

climáticas de baixa umidade relativa, o fungo cresce no interior do ovário. Inicialmente o fungo tem uma coloração creme e formato cilíndrico, alongado e levemente curvado, dando origem a esclerócios pouco contaminados (Futtrell & Webster, 1966).

No plantio seguinte, os ascósporos produzidos nas estruturas sexuais provenientes da germinação dos esclerócios e/ou os conídios produzidos da mela atingem os floretes das panículas sadias, recomençando o ciclo da doença (Bandyopadhyay, 1990). O papel de hospedeiras secundárias ou alternativas e do sorgo selvagem precisa ser investigado para melhor compreensão do ciclo da doença (Bandyopadhyay et al., 1998).

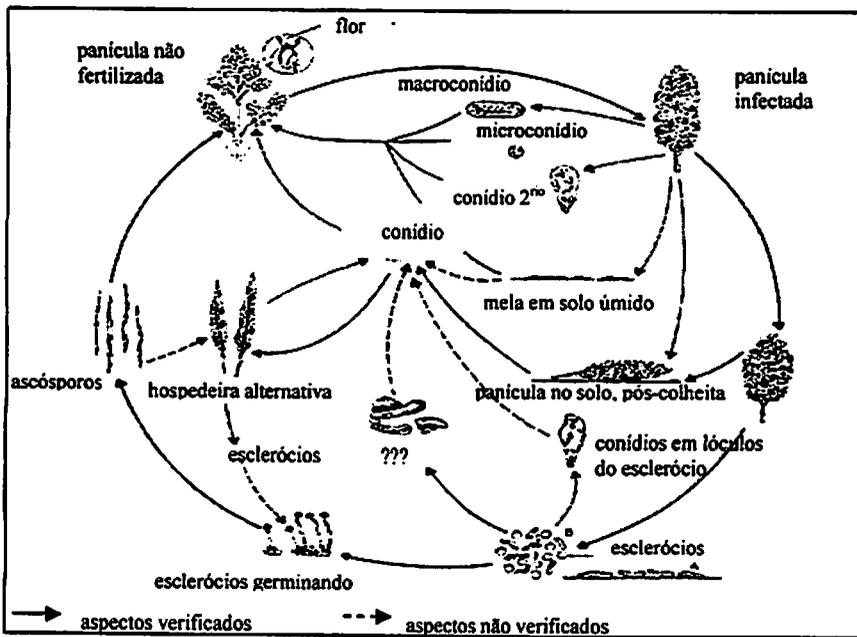


FIGURA 1. Ciclo de vida de *C. africana*, agente etiológico da mela do sorgo (adaptado de Agrios, 1997)

3.6 Controle

A ausência de genótipos de sorgo resistentes a espécies de *Claviceps* e o estabelecimento da doença somente em flores não fertilizadas exigem que se adotem técnicas de manejo da cultura capazes de promover alta produção de pólen, bem como a adoção de medidas que reduzam a fonte primária e secundária de inóculo (Bandyopadhyay et al., 1998).

Assim, a severidade da doença está diretamente relacionada à viabilidade do pólen. Programas de melhoramento baseados no manejo do pólen para minimizar a oportunidade da infecção por *Claviceps* são vistos como uma das mais eficientes estratégias para controlar a doença (Bandyopadhyay et al., 1998). Assim, um dos aspectos que favorecem o escape é a produção de linhagens com uma boa disponibilidade de pólen viável, uma vez que a infecção não ocorre em flores fertilizadas. Por outro lado, é de suma importância a programação de plantio a fim de que haja uma boa coincidência de florescimento entre as linhagens macho e fêmea para garantir uma rápida fertilização (Bandyopadhyay et al., 1998).

Por meio de métodos de inoculação artificial foram identificadas até 12 linhagens de sorgo com eficiência na redução da doença (Musabyimana et al. 1995; Muku, 1999; Tegegne et al., 1994); entretanto, genótipos que aparentemente são resistentes em um local podem ser suscetíveis em outro. McLaren & Wehner (1990) detectaram 70 linhagens de sorgo com resistência; entretanto, pequenas variações climáticas culminaram em uma alta incidência da doença.

O controle químico é, obrigatoriamente, utilizado para a produção de sementes híbridas, com pulverizações realizadas com jato dirigido para as panículas, de forma a permitir a proteção individual das flores contra o ataque do patógeno, durante todo o período de florescimento. No Brasil, vários grupos de fungicidas têm sido testados e nos anos de 1995 e 1996, o grupo dos triazóis foi

identificado como potencialmente efetivo para o controle da doença açucarada. Entretanto, os fungicidas testados são pouco eficientes em baixas concentrações, com isso alguns causam fitotoxicidade quando aplicados em dosagens eficazes (Pinto et al., 1997). O fungicida tebuconazole é o único registrado no Brasil para o controle da doença açucarada do sorgo. Recomendam-se três pulverizações 66,7 g i.a/ha, iniciadas logo após o início da antese, com intervalos de aplicação de 5 a 6 dias (Pinto, 1999).

A doença pode ser controlada por meio de um manejo integrado, pela adoção das seguintes medidas: (1) uso de sementes livres de esclerócios do patógeno; (2) uso de cultivares bem adaptadas às regiões de plantio e mais tolerantes a baixas temperaturas; (3) semeadura em épocas em que o período de florescimento não coincida com baixas temperaturas; (4) remoção de restos culturais e de plantas hospedeiras alternativas do patógeno; (5) adequação da proporção de linhagens macho-estéreis e restauradoras, em campos de produção de sementes, garantindo boa disponibilidade de pólen; e (6) programação de plantio, coincidindo com o florescimento entre as linhagens restauradoras e macho estéreis, para garantir uma rápida fertilização (Bandyopadhyay et al., 1998).

3.7 Caracterização molecular de espécies de *Claviceps* em sorgo

Estudos moleculares têm desempenhado um papel importante e esclarecedor na taxonomia das espécies de *Claviceps*, permitindo uma compreensão sobre a distribuição geográfica, a especificidade e as relações co-evolucionárias entre patógeno-hospedeiro (Pazoutová et al., 2000, Pazoutová, 2001, Tooley et al., 2001, Komolong et al., 2002, Pazoutová & Bogo, 2002, Tooley et al. 2002, Pazoutová et al., 2004).

Seqüenciamentos de regiões específicas do DNA confirmaram as diferenças entre as espécies de *Claviceps* que ocorrem em sorgo (Pazoutová et

al., 2000; Pazoutová, 2001). Análises da região total ou específica do genoma, como, por exemplo, do íntron 3 do gene da β -tubulina e do íntron 4 do gene do fator de alongação (EF- α), por meio de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAM (*Random Amplified Microsatellite*), distinguiram espécies de *Claviceps* do sorgo provenientes de diferentes regiões do mundo. As variações observadas nas seqüências de nucleotídeos de diferentes isolados de *C. africana* podem vir a servir como critério para separação das espécies (Tooley et al., 2001).

Métodos moleculares, os quais envolvem a manipulação de DNA e incluem extração, quantificação, sistemas de amplificação pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*), clonagem, eletroforese e seqüenciamento do genoma total ou parcial do DNA, são bastante úteis para estudar a diversidade populacional de *Claviceps* spp. e monitorar a migração do patógeno. Tooley et al. (2000) analisaram os genótipos do patógeno e verificaram que a mesma população estaria causando a doença ao longo do ano. Todavia, não confirmaram se o patógeno estariam sobrevivendo em hospedeiras alternativas de uma estação de cultivo para outra ou se o inóculo inicial é proveniente de populações de outras regiões.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, Brasil: FNP Consultoria & Comércio, 2004.

ALDERMAN, S.C. Diversity and Speciation in *Claviceps*. In.: WHITE JR. et al. (Ed.). *Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts*. New York: M. Dekker, 2003. p.195-245.

BANDYOPADHYAY, R. et al. Ergot: a global threat to sorghum. *International Sorghum Millets. NewsLetter*. v.37, p.1-32, 1996.

BANDYOPADHYAY, R. et al. Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Disease*, Saint Paul, v.82, n.4, p.356-367, Apr. 1998.

BANDYOPADHYAY, R. et al. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.80, n.9, p.812-818, Sept. 1990.

BARR, M. E. Prodomus to nonlichenized, pyrenomycetous members of Class Hymenomycetes. *Mycotaxon*, Ithaca, v.34, p.43-184, 1990.

BROOKING, I.R. Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperatures. II. Genotypic differences in susceptibility. *Australian Journal Plant Physiology*, v.6, p.143-147, 1979.

CAMPBELL, W.P. Inhibition of starch formation by *Claviceps purpurea*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.49, p.451-452, 1959.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J.A. Sugary disease of sorghum in Brazil: an overview. In: THE GLOBAL CONFERENCE ON

ERGOT OF SORGHUM, 1997, Sete Lagoas. **Proceedings...** Sete Lagoas: EMBRAPA/INTSORMIL, 1999. p.23-25. (Publication, 99).

ERIKSSON, O.E. Outline of the ascomycetes – 2006. **Myconet**, v.12, p.1-82, 2006.

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Ocorrência de *Claviceps sorghi*, agente causal da doença ergot no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.302, ago. 1995. Supl.

FREDERICKSON, D.E.; MANTLE, P.G. The path of infection of sorghum by *Claviceps sorghi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.33, n.2, p.221-234, Sept. 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**, Great Britain, v.93, n.4, p.497-502, Apr. 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**, Great Britain, v.95, n.9, p.1101-1107, Sept. 1991.

FUTTRELL, M.C.; WEBSTER, O.J. Host range and epidemiology of the sorghum ergot organism. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v.50, n.11, p.828-831, Nov. 1966.

HANSON, M. R. Plant mitochondrial mutations and male sterility. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.25, p.461-486, Dec. 1991.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M. Patogénesis de *Claviceps africana* en ovarios de sorgo. **Agrociencia**, v.35, n. 5, p.535-542, Sept./Out. 2001.

HODGE, K.T. Clavicipitaceous anamorphs. In: WHITE JR. et al. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts.** New York: M. Dekker, 2003. p.75-123.

HOUSE, L.R. **A guide to sorghum breeding.** Patancheru: ICRISAT, 1985. 206p.

KAUL, M. L. H. **Male sterility in higher plants.** Berlin: Springer-Verlag, 1988. 1005p.

KIRK P.M. et al. **Dictionary the fungi.** 9.ed. Wallingford, UK: CAB International, 2001.

KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; THEBTARANONTH, Y. Secondary metabolites of clavicipitalean fungi. In.: WHITE JR. et al. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts.** New York: M. Dekker, 2003.

KOMOLONG, B. et al. Identity and genetic diversity of the sorghum ergot pathogen in Australia. **Aust. Journal Agric. Res.**, v.53, n.6, p.621-628, 2002.

KULKARNI, B.G.P.; SESHADRI, V.S.; HEGDE, R.K. The perfect stage of *Sphacelia sorghi* McRae. **Mysore Journal Agricultural Science**, Bangalore, v.1, n.2, p.286-289, 1976.

LEVINGS , C. S. III. The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. **Science**, v. 250, p. 942-947, Nov. 1990.

LUTTRELL, E.S. The disease cycle and fungus-host relations in Dallisgrass ergot. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, n.12, p.1461-1468, Dec. 1977.

LUTTRELL, E.S. Tissue replacement diseases caused by fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Auto, v.19, p.373-389, 1981.

MANTLE, P.G. Production of ergot alkaloids *in vitro* by *Sphacelia sorghi*. **Journal of General Microbiology**, UK, v.75, p.275-281, 1973.

McLAREN, N.W. Quantifying resistance of sorghum genotypes to the sugary disease pathogen (*Claviceps africana*). **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.10, p.986-988, Oct. 1992.

MCLAREN, N.W.; WEHNER, A. Relationship between climatic variables during early flowering of sorghum and the incidence of sugary disease caused by *Sphacelia sorghi*. **Journal Phytopathology**, v.130, p.82-88, 1990.

McRAE, W. Notes on some South Indian fungi. **Madras Agricultural Yearbook**, p.108-111, 1917.

MILLER, J.H. A revision of the classification of the ascomycetes with special emphasis on the Pyrenomycetes. **Mycologia**, UK, v. 41, n.2, p. 99-127, Mar./Apr. 1949

MOWER, R.L.; HANCOCK, J.G. Mechanism of honeydew formation by *Claviceps* species. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, n.12, p.2826-2834, Dec. 1975a.

MOWER, R.L.; HANCOCK, J.G. Sugar composition of ergot honeydews. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, n.12, p.2813-2825, Dec. 1975b.

MUKURU, S. Z. The ergot disease of sorghum in Africa. In: GLOBAL CONFERENCE ON ERGOT OF SORGHUM, 1997, Sete Lagoas, MG. **Proceedings...** Sete Lagoas, MG, 1999. p.55-58.

MURTY, D.S.; TABO, R.; AJAYI, O. **Sorghum hybrid seed production and management**. ICRISAT, 1994. 67p. (Information Bulletin, 41).

MUSABYIAMANA, T.; SEHENE, C.; BANDYOPADHYAY, R. Ergot resistance in sorghum in relation to flowering, inoculation technique and disease development. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, n.1, p.109-115, Jan./Fev. 1995.

- ODVODY, G. Control and management of sorghum ergot. In: DAHLBERG, J.A. (Ed.). **Proceedings for the Status of Sorghum Ergot in North America**, Corpus Christi, Texas; June 24-26, 1998.
- PAZOUTOVÁ, S. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In.: WHITE JR. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts**. New York: M. Dekker. 2003. p.329-354.
- PAZOUTOVÁ, S. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. **Mycological Research**, UK, v.105, n.3, p. 275-283, Mar. 2001.
- PAZOUTOVÁ, S. et al. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.4, p.437-442, Apr. 2000.
- PAZOUTOVÁ, S.; BOGO, A. *Heteropogon triticeus*, a new host of *Claviceps sorghi* in India. **Journal Phytopathology**, v.150, n.4, p.196-198, Apr. 2002.
- PAZOUTOVÁ, S.; KOLARÍK, M.; KOLÍNSKÁ, R. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. **Mycological Research**, UK, v.108, n.2, p.126-135, Feb. 2004.
- PINHO, R. G. V.; VASCONCELOS, R. C. de. **Cultura do sorgo**. Lavras-MG: UFLA /FAEPE, 2002. v. 1. 76p
- PINTO, N. F. J de A. **Patologia de sementes de sorgo**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA-CNPMS, 1999. (Circular Técnica, 32).
- PINTO, N. F. J. DE A.; FERREIRA, A. S.; CASELA, R. C. **Ergot (*Claviceps africana*) ou doença açucarada do sorgo**. EMBRAPA Milho e Sorgo, 1997. (Circular Técnica, 23).
- REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; CASA, R. T. Doença açucarada do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.3, p. 249-490, Sept. 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**, Saint Paul, v.80, n.4, p.463, Apr. 1996.

REYNOLDS, D.R. **Ascomycetes systematics: the Luttrellian concept**. New York: Springer-Verlag, 1981. 242p.

RIBAS, P.M. Importância econômica. In: RODRIGUES, J.A.S.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA Milho e Sorgo. 2000a. (Sistema de produção, 2).

RIBAS, P.M. Plantio: a implantação da cultura. In: RODRIGUES, J.A.S.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, Embrapa Milho e Sorgo. 2000b. (Sistema de produção, 2).

RYKARD, D.M.; LUTTRELL, E.S. Conidiogenesis and conidiomata in the Clavicipitoideae. **Mycologia**, New York, v.76, n. 6, p.1095-1103, June 1984.

RYLEY, M.J. et al. An overview of the biology of sorghum ergot. In.: LESLIE, J.F. (Ed.). **Sorghum and millet diseases**. Iowa: Iowa State, 2002. p.141-150.

SANGITRAO, C.S.; BADE, G.H. Meteorological factors associated with honey dew development and sclerotial stage in sorghum ergot. **Sorghum Newsletter**, Saint Paul, v. 22, p.107-108, 1979.

SANTOS, F.G. dos. Cultivares: cultivares de sorgo. In: RODRIGUES, J.A.S.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. Sete Lagoas, MG. Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Sistema de produção, 2).

SANTOS, F.G. dos; CASELA, C.R.; WAQUIL, J.M. Melhoramento de sorgo. In.: BOREM, A. **Melhoramento das espécies cultivadas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. p.605-812.

SPATAFORA, J.W.; BLACKWELL, M. Molecular systematics of unitunicate perithecial ascomycetes: the Clavicipitales-Hypocreales connection. *Mycologia*, New York, v. 85, n.6, p. 912-922, Nov./Dec. 1993.

STEPHENS, J.C; HOLLAND, R.F. Cytoplasmatic male-sterility for hybrid sorghum seed production. *Agronomy Journal*, Madison, v.46, p. 20-23, 1954.

TEGEGNE, G. et al. Screening for ergot resistance in sorghum. *Plant Disease*, Saint Paul, v.78, n.9, p.873-876, Sept. 1994.

TOOLEY, P.W. et al. Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. *Mycologia*, UK, v.93, n.3, p.541-551, May/ June 2001.

TOOLEY, P.W., GOLEY, E.D.; CARRAS, M.M. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from United States, Mexico, Africa, Australia, India and Japan. *Plant Disease*, Saint Paul, v.86, n.11, p.1247-1252, Nov. 2002.

TOOLEY, P.W. et al. Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analyses. *Phytopathology*, Saint Paul, v.90, n.10, p.1126-1130, Oct. 2000.

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

TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B; OESER, B. *Claviceps purpurea*. In.: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R.P. (Ed.). *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases*. Eukaryotes. Kidlington, UK: Elsevier Science, 1995. v. 2, p.161-187.

WHITE JR. et al. Historical perspectives: human interactions with clavicipitalean fungi. In.: WHITE JR., J.F. (Ed.). *Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts*. New York: M. Dekker. 2003. p.1-15.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA FASE ANAMÓRFICA (*Sphacelia* spp.) DE ESPÉCIES DE *Claviceps* DE SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO BRASIL

1 RESUMO

CHAVES, Zuleide Martins. Isolamento e caracterização *in vivo* e *in vitro* da fase anamórfica (*Sphacelia* spp.) de espécies de *Claviceps* de sorgo e outras gramíneas forrageiras no Brasil. 2006, p. 32-60, Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.³

Na mela do sorgo ocorre um grande número de leveduras e fungos filamentosos associados ao exsudato, os quais dificultam a obtenção de culturas puras, importantes para a caracterização do patógeno *in vitro* e a produção de biomassa para a extração de DNA. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer um método de isolamento de espécies de *Claviceps*, a fim de formar uma coleção *ex-situ* do patógeno para estudos *in vitro*, e caracterizar morfológicamente os isolados provenientes de sorgo e outras gramíneas forrageiras no Brasil. Panículas de plantas com sintomas da doença açucarada foram coletadas nos municípios de Lavras, Sete Lagoas, Uberlândia e Montes Claros. Foram testados 10 meios de cultura contendo diferentes antibióticos, sendo que o meio MIC 10 (batata, sacarose, vitamina, solução de micronutrientes e agar, acrescido de gentamicina e tetraciclina) mostrou-se o mais eficiente e foi usado, então, para o isolamento e crescimento das colônias. Os isolados foram caracterizados quanto à morfologia e taxa de crescimento da colônia em meio de cultura e tamanho e formato dos macroconídios em substrato natural e *in vitro*. O uso de gentamicina e tetraciclina foi eficaz em eliminar o principal contaminante *Aureobasidium pullulans* e permitiu a obtenção de culturas puras. Em sorgo, os macroconídios de *Claviceps* são oblongos a ovais, com 10-20 x 5-8 µm. Há uma produção escassa de microconídios e conídios secundários. Em *P. maximum*, os macroconídios de *Claviceps* são elípticos, com 13-20 µm x 4-6 µm; e em *B. brizantha* e *B. decumbens*, oblongos a levemente alantóides, com 11-19 µm x 3-5 µm. Em meio de cultura, os isolados de *Claviceps* de sorgo formaram colônias brancas, velutinosas, com micélio aéreo. Os isolados provenientes de *Brachiaria* e *Panicum* formaram colônias brancas, com aspecto úmido, com pouco micélio aéreo e crescimento rápido. A observação desses marcadores permite concluir que a mela do sorgo e demais forrageiras é causada por, no mínimo, duas espécies distintas de *Claviceps*. Os isolados obtidos de *Panicum* e *Brachiaria* apresentaram características próximas a *C. maximensis*.

³ Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Orientador), Carlos R. Casela – EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-orientador)

2 ABSTRACT

CHAVES, Zuleide Martins. Isolation and *in vivo* and *in vitro* characterization of the anamorphic phase (*Sphacelia* spp.) of species of *Claviceps* from sorghum and other forage grasses in Brazil. 2006, p. 32-60, Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras MG.⁴

A high number of yeasts and filamentous fungi occur, as contaminants, associated to the honeydew of the sugary disease in grasses which turns difficult the process of isolation of *Claviceps* sp. An important aspect for the characterization of the pathogen *in vitro* and for biomass production for DNA extraction is to have of cultures of the pathogen. The objectives of this work were to establish a method for isolation of species of *Claviceps* in order to form a collection *ex-situ* for *in vitro* studies and to characterize morphologically isolates of *Claviceps* spp. originated from sorghum and other forage grasses in Brazil. Panicles were sampled from symptomatic and asymptomatic plants in the counties of Lavras, Sete Lagoas, Uberlândia and Montes Claros in the state of Minas Gerais. Ten different culture media added with different antibiotics were tested initially and MIC 10 (potato, sucrose, vitamin, micronutrient solution and agar amended with gentamicin e tetracycline) showed to be the most efficient for the isolation of the organism. Isolates of *Claviceps* sp. were then characterized for colony morphology, growth rate, size and shape of macroconidia in natural substrate and *in vitro*. The use of gentamicin and tetracyclin was efficient to eliminate the main contaminant *Aureobasidium pullulans* and allowed to obtain pure cultures. In sorghum, macroconidia of *Claviceps* were oblong to ovals, 10-20 µm x 5-8 µm, with sparse production of microconidia and secondary conidia. In *P. maximum*, the macroconidia of *Claviceps* were elliptical, 13-20 µm x 4-6 µm, in *B. brizantha* and *B. decumbens* oblong to slightly alantoid, 11-19 µm x 3-5 µm. In culture, isolates of *Claviceps* of sorghum formed white colonies with aerial mycelium and the isolates originated from *Brachiaria* and *Panicum* formed white, flat colonies, with moist appearance, little aerial micelium and fast growth. These results allowed to conclude that ergot of sorghum and other grasses is caused by, at least, two distinct species of *Claviceps*. The isolates obtained from *Panicum* and *Brachiaria* showed characteristics close to *C. maximensis*.

⁴ Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Adviser), Carlos R. Casela - EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-Adviser)

3 INTRODUÇÃO

A mela do sorgo, do ponto de vista econômico, apresenta dois aspectos importantes, sendo um prejudicial e outro benéfico, a saber: (1) a contaminação de sementes com esclerócios pode reduzir severamente a qualidade dos grãos devido à deformação dos mesmos e à presença dos alcalóides, que afetam o sistema nervoso central de animais; e (2) porque as substâncias produzidas pelo fungo, alcalóides, são exploradas na biotecnologia em larga escala, visto seu alto valor farmacêutico (Tudzynski & Tenberge, 2003).

Poucos são os relatos de intoxicação de animais pela ingestão de sementes contaminadas com o fungo devido à baixa toxicidade dos alcalóides presentes nos esclerócios produzidos no sorgo. No Brasil, não foram bem estudadas as interações entre a toxicidade a animais e os fatores que interferem na produção de toxinas por *Claviceps* em sorgo. Na década de 1980, no Rio Grande do Sul, foram registrados surtos de intoxicação em bovinos causados por *Claviceps paspali* F. Stevens & J.G. Hall, pela ingestão de sementes de *Paspalum dilatatum* Poir e *P. notatum* Flugger contaminadas. Entretanto, os alcalóides produzidos por *C. paspali* são diferentes dos produzidos pelas espécies que infectam sorgo (Riet-Correa et al., 1983).

Em 1976, *C. sorghi* foi descrito como a fase teleomórfica do agente etiológico da doença no sorgo, até então conhecido apenas pela sua fase anamórfica como *S. sorghi* (Kulkarni et al., 1976). Em 1991, foram constatadas diferenças significativas nas características morfológicas do esclerócio, do estroma e da fase ascogênica, na composição dos açúcares produzidos nas panículas infectadas e na natureza química e quantidade de alcalóides das espécies procedentes da Índia e da África. Com base nestas características, o

patógeno africano foi descrito como uma espécie distinta, *C. africana* (Frederickson et al., 1991). No Japão, a ocorrência de “ergot” no sorgo foi constatada na década de 1980, porém foram observadas diferenças em relação ao “ergot” africano quanto à sintomatologia da doença e à morfologia do fungo, o qual foi descrito como uma nova espécie endêmica nesta região. Isso foi confirmado pelas diferenças na morfologia do teleomorfo e do anamorfo e por diferenças na qualidade dos alcalóides produzidos (Tsukiboshi et al., 1999).

Diferentes aspectos da doença foram estudados, como, por exemplo, as vias de propagação e os fatores que proporcionam o progresso da doença (Chinnadurai et al., 1970; Sangitrao & Bade, 1979; Frederickson et al., 1989), os quais influenciam a formação e a natureza dos exsudatos açucarados (Mower & Hancock, 1975 a, b) ou a formação, a natureza e o modo de ação dos alcalóides (Mantle, 1973). A relação entre a influência de fatores climáticos e as vias de infecção do patógeno e a incidência da doença em sorgo foi amplamente investigada em diversas regiões do mundo (Frederickson & Mantle, 1988; McLaren & Wehner, 1990; McLaren & Flett, 1998). A doença torna-se mais severa na produção de sementes híbridas quando se utilizam linhagens com macho-esterilidade citoplasmática, como fêmeas parentais e linhagens restauradoras que não florescem simultaneamente (Bandyopadhyay et al. 1998, Ryley et al., 2002).

O patógeno que causa a doença açucarada no Brasil foi identificado como *C. africana* (Reis et al., 1996). Entretanto, a identificação foi realizada com base na fase anamórfica (*S. sorghi*), a qual é comum às três espécies de *Claviceps* que infectam sorgo.

As tentativas de obtenção de culturas puras da fase anamórfica (*Sphacelia*), conforme preconiza a literatura (Chinnadurai et al., 1970, Pazoutová et al., 2000; Tooley et al., 2002), têm demonstrado elevado grau de insucesso, principalmente devido à ocorrência sistemática de um fungo

leveduriforme presente no exsudato, além de outros fungos filamentosos que geralmente o colonizam (Bandyopadhyay et al., 1990; González et al., 1997; Bhuiyan et al., 2003). Estes fatores inviabilizaram a formação de uma coleção de isolados desse fungo, condição essencial para o desenvolvimento de estudos sobre a genética do fungo e a epidemiologia da doença, principalmente quando o objetivo é o desenvolvimento de estratégias para o manejo da doença.

Diante do exposto, objetivou-se: i) estabelecer uma metodologia de isolamento de *Claviceps* e formar uma coleção *ex-situ* do patógeno para estudos *in vitro*; e ii) caracterizar morfológicamente isolados de *Claviceps* sp. provenientes de sorgo e de gramíneas forrageiras, no Brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos e em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras MG, e nos laboratórios de Microbiologia e Física de Solos e Resistência de Plantas a Doenças da EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG.

Diante da presença constante de fungos filamentosos, leveduras e bactérias associadas ao exsudato produzido pela infecção com diferentes espécies de *Claviceps*, foram estabelecidas etapas visando obter uma metodologia eficiente para o isolamento deste fungo.

4.1 Isolamento e manutenção de espécies de *Claviceps*

Paniculas de sorgo e de gramíneas forrageiras com sintomas de mela foram coletadas nos municípios mineiros de Lavras, Montes Claros, Sete Lagoas e Uberlândia (Tabela 1A).

4.1.1 Avaliação de métodos para o isolamento

Para o isolamento de *Claviceps* spp. foram utilizados os meios de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), Kirchoff e T2 (Chinnadurai et al., 1970; Pazoutová et al., 2000) (Tabela 2A).

4.1.1.1 Seleção de antibióticos contra contaminantes leveduriformes

Os antibióticos utilizados foram os seguintes: estreptomicina (100 µg/mL), ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (100 µg/mL), gentamicina (1000 µg/mL) e tetraciclina (500 µg/mL). As suspensões dos antibióticos foram

esterilizadas por filtração. Os antibióticos foram testados cada um isoladamente e em combinações dois a dois, adicionados ao meio de cultura BDA.

4.1.1.2 Isolamento

Gotas da mela *in natura* de coloração transparente a levemente opaca, presentes nas panículas infectadas de sorgo e de capim colônião (*P. maximum*), foram retiradas com uma alça de platina e transferidas para placas contendo os meios BDA, Kirchoff e T2. Todos os meios continham a solução do antibiótico estreptomicina (2 mL por 250 mL de meio). Uma alíquota de 100 mL de água destilada estéril foi despejada sobre a gota para facilitar a dispersão dos macroconídios, que foram espalhados com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em temperatura ambiente, entre 25 e 28 °C, e feito o monitoramento diário sob microscopia óptica e/ou estereoscópica.

4.1.1.3 Eliminação de contaminantes

Com uma alça de Drigalski retirou-se uma fração da colônia do contaminante leveduriforme para ser diluída em 10 mL de água estéril. A partir desta suspensão prepararam-se diluições em série (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pela retirada seqüencial de uma alíquota de 0,1 mL de suspensão do contaminante e o material foi transferido para tubo de ensaio contendo 0,9 mL de água estéril. As diluições foram distribuídas individualmente em placas contendo os referidos meios de cultura e as combinações dos diferentes antibióticos supracitados. Após 48 horas, efetuou-se a contagem de colônias.

4.1.1.4 Seleção de meios

Para otimizar o crescimento micelial dos isolados de *Claviceps* de sorgo e de gramíneas forrageiras, foram testados 10 meios de cultura com diferentes fontes de carbono em suas composições (Tabela 2 e Tabela 2A). As fontes de carbono utilizadas nos meios foram ácido málico, frutose, manose e sacarose.

Discos de quatro milímetros foram transferidos para o centro das placas contendo cada meio, com três repetições, os quais foram incubados em temperatura ambiente. Após seis dias de crescimento avaliou-se o diâmetro das colônias.

TABELA 2. Meios de cultura utilizados no teste de seleção de meios.

| Meio de cultura | |
|------------------------|---|
| MIC1 | Meio Kirchhoff |
| MIC2 | MSB (meio Kirchhoff modificado) |
| MIC3 | NFb Tween 80 |
| MIC4 | NFb Málico |
| MIC5 | Frutose com sacarose |
| MIC6 | MS (meio T2 modificado) mais antibiótico |
| MIC7 | Manose com sacarose (com vitaminas e micronutrientes) |
| MIC8 | Ácido málico (com vitaminas e micronutrientes) |
| MIC9 | BDA com antibiótico |
| MIC10 | Sacarose (com vitaminas e micronutrientes) |

4.1.2 Isolamento e montagem da coleção

Depois de estabelecida a melhor metodologia para isolamento (meio de cultura e o antibiótico mais eficiente para inibir o crescimento de contaminantes), foram realizados novos isolamentos para compor uma coleção *ex-situ* do patógeno.

Gotas da mela fresca de coloração transparente a levemente opaca, presentes nas panículas infectadas, foram retiradas com uma alça de platina e

transferidas para meio de cultura MIC 10. Foram acrescentados 100 mL de água destilada esterilizada sobre a gota para facilitar a dispersão dos macroconídios. As placas foram incubadas em temperatura ambiente, entre 25 a 28 °C.

As placas foram monitoradas diariamente sob microscópio de luz e estereoscópio. Após o surgimento das primeiras colônias livres de contaminantes, estas eram transferidas para uma nova placa contendo o mesmo meio usado no isolamento. Repetiu-se este procedimento de transferência das subculturas para novas placas quantas vezes foram necessárias, em média três vezes, até serem obtidas as culturas puras do fungo.

4.2 Caracterização morfológica *in vivo*

Para as avaliações *in vivo* foram montadas lâminas com gotas da mela *in natura*. Com uma alça de platina foram retiradas gotas da panícula, as quais foram colocadas na lâmina com lactoglicerol ou corante azul de algodão e cobertas com uma lamínula.

Sementes de sorgo sadias e em estágio inicial de infecção foram cortadas na região inferior do ovário e colocadas em lâminas para visualização da célula conidiogênica. Os cortes, de cerca de 50 µm, foram observados em um microscópio Zeiss modelo Axioplan, em que se realizaram as medidas, as observações morfológicas e os registros fotográficos.

Foram realizadas coletas diárias dos floretes das panículas de sorgo a partir de 24 horas após a inoculação até o oitavo dia. Floretes de panículas infectadas de *B. decumbens* foram coletados, lavados superficialmente para retirar excesso da mela e, juntamente com as amostras de sorgo, preparados para observações em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todas as amostras foram tratadas com Fixador de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5 %; formaldeído 2,5 %; tampão cacodilato de sódio 0,05 M; CaCl₂ 0,001M; pH 7,2) por um período mínimo de 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄)

a 1% por 1 hora. As amostras foram lavadas em água destilada e submetidas, a seguir, a sucessivas lavagens por 20 minutos em soluções com concentrações crescentes de etanol (25, 50, 75, 90 e 100%). Ao final, as amostras foram passadas por três vezes na solução de etanol a 100% e por três vezes em solução de acetona a 100%. Após o processo de desidratação, as amostras foram levadas para secagem ao ponto crítico (CPD 030 – Critical Point Dryer/BAL-TEC), montadas em suporte de alumínio, metalizadas (SCD 050 – Sputter Coater/BAL-TEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO 40). As imagens foram geradas e registradas digitalmente, e posteriormente selecionadas para a montagem das ilustrações.

4.3 Caracterização morfológica *in vitro*

Para as avaliações *in vitro* utilizou-se o meio de cultura MIC10, por ter apresentado o melhor resultado nos ensaios anteriores, acrescido dos antibióticos gentamicina e tetraciclina. Discos de quatro milímetros das colônias puras isoladas de *Claviceps* proveniente do sorgo e de *P. maximum* foram colocados em meio MIC 10 e incubados em temperatura ambiente. Avaliou-se o diâmetro das colônias aos 5, 10, 15 e 20 dias após o plaqueamento. Foram realizadas observações do crescimento e coloração das culturas e realizados registros fotográficos.

Para as observações de MEV, foram preparadas placas com meio MIC 10 com ágar a 3%. No centro da placa foram colocados discos de quatro milímetros das colônias puras. Foram plaqueados isolados de *Claviceps* provenientes do sorgo e de *P. maximum*. Após 15 dias de crescimento as placas foram colocadas invertidas em geladeira a 4 °C, por 20 dias. Ao final deste período foram retirados fragmentos das colônias de 1cm², os quais foram preparados para MEV segundo especificação para as amostras *in vivo*.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e manutenção de espécies de *Claviceps*

No isolamento de *Claviceps* a partir do exsudato produzido nas panículas, foi observada a presença de vários fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, entre outros. Entretanto, o principal fator limitante ao isolamento de *Claviceps* foi o constante e rápido crescimento de um fungo com aspecto leveduriforme, identificado como *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (Figura 1).

Nos isolados de *Claviceps* proveniente de sorgo, foi observada a formação de macroconídios, microconídios e conídios secundários, os quais eram formados por germinação dos macroconídios. No isolado de *Claviceps* sp. proveniente de *P. maximum*, a presença de microconídios foi menor e os macroconídios normalmente germinavam, dando origem a hifas e, ocasionalmente, a conídios secundários. Entretanto, em nenhum dos casos foi observado desenvolvimento de colônias, uma vez que a partir do segundo dia as placas já estavam totalmente cobertas pelo contaminante.

Efetuaram-se testes com diferentes antibióticos e a diferentes concentrações, visando inibir o crescimento dos microrganismos contaminantes. Em contraste com os demais antibióticos que apresentaram efeitos negligenciáveis, a inclusão conjunta de gentamicina e tetraciclina propiciou uma redução acentuada do número de colônias de *A. pullulans* nas placas. Assim, com o uso da combinação desses antibióticos foram eliminadas as subculturas em série. Nesse caso, necessita-se de apenas uma transferência de colônias para novo meio, quatro a oito dias após o plaqueamento, dependendo da espécie do

patógeno. Os isolados de *P. maximum* apresentaram maior taxa de crescimento em relação aos isolados de sorgo.

A germinação de macroconídios de *Claviceps* provenientes de sorgo, *Brachiaria* spp. e *P. maximum* variou de 0 a 81% em seis dos meios testados. Entretanto, verificou-se que as colônias de *Claviceps* também tiveram desenvolvimento micelial limitado nos meios com tween 80 (MIC 2) e ácido D-málico (MIC 4 e MIC 8). Por outro lado, em meio BDA houve elevada germinação, 81%, mas também ocorreu desenvolvimento de leveduras, impedindo a obtenção de colônias puras. 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 e menor taxa de crescimento nos meios MIC 1, MIC 2, MIC 3 e MIC 4. Resultados similares foram observados quando foram comparados quatro meios para o acúmulo de massa micelial em meio líquido sem agitação, com a inclusão de fonte de nitrogênio, 1g/L de NH₄Cl. As colônias que se desenvolveram em meio MIC 10 apresentaram maior massa micelial.

Depois de estabelecido que o melhor meio para isolamento foi o MIC 10, foram obtidos 15 isolados de *Claviceps* de sorgo e gramíneas forrageiras de diferentes regiões (Tabela 1A). Os isolados foram mantidos em placas e em tubos de ensaio com meio MIC 10, em temperatura ambiente, e armazenados para a utilização nas etapas seguintes.

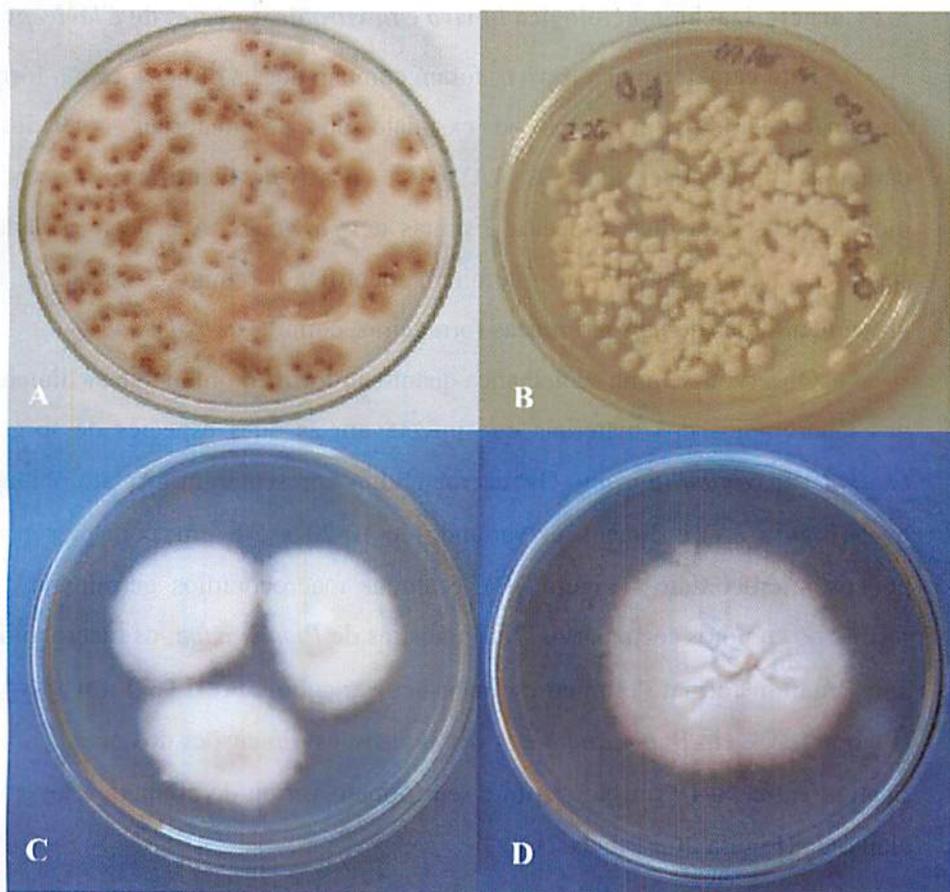


FIGURA 1. A. Fotografias das colônias do principal fungo contaminante (*Aureobasidium pulullans*) em meio BDA. B. Colônias de *Claviceps* - meio BDA. C - Colônias de *Claviceps africana* em meio MIC 10. D - *C. maximensis* isolado de *P. maximum*. em meio MIC 10. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Caracterização morfológica *in vivo* e *in vitro* de espécies de *Claviceps*

Para caracterização *in vivo*, foram comparados as dimensões e o formato dos macroconídios presentes no exsudato dos 15 materiais coletados de panículas infectadas (Tabela 1A). Foi possível identificar marcadores morfológicos para duas espécies distintas de *Claviceps*. A espécie isolada do sorgo tem características que permitem identificá-la como *C. africana*, e as provenientes das demais gramíneas forrageiras, como *C. maximensis*.

Observou-se uma semelhança quanto ao formato oblongo e as dimensões dos macronídios dos materiais que infectavam as duas espécies de sorgo (*S. bicolor* e *S. verticilliflorum*). Os macroconídios apresentaram formato oblongo a oval (Figura 2A) e dimensões variando de 10-20 x 5-8 μm , com presença de poucos microconídios (Figura 4B), e alguns macroconídios germinaram para formar os conídios secundários. Nas amostras de *P. maximum*, os macroconídios apresentaram formato elíptico e dimensões variando entre 13-20 μm x 4-6 μm (Figura 2B), e em *B. brizantha* e *B. decumbens*, as dimensões dos macroconídios ficaram entre 11-19 μm x 3-5 μm e seu formato variou de oblongo a levemente alantóide (Figura 2C, Tabela 2).

Na visualização da célula conidiogênica de *C. africana*, em microscopia de luz, observou-se a formação de fiálides sobre a camada de tecido pseudoestromático de textura *angularis* (Figura 3A), o que ficou bem visível em MEV (Figura 3B). Entretanto, em ovários de *Brachiaria* sp. colonizados pelo fungo, as células conidiogênicas, também fialídicas, eram formadas em micélio livre e não em tecido estromático, como visto em sorgo (Figura 4A)

Nas observações *in vitro*, o isolado CML 442 formou colônias brancas, velutinosas, com micélio aéreo e crescimento lento em meio MIC 10. Os isolados CML 436 e CML 446 de *P. maximum* de *Brachiaria*, respectivamente,

formaram colônias brancas, com aspecto úmido, lisas e achatadas, com pouco micélio aéreo e crescimento rápido em MIC 10 (Figura 1D).

TABELA 3. Morfologia dos macroconídios, hospedeiros e origem das espécies de *Claviceps*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

| Fungo | Macroconídios | Hospedeiros | Localidade |
|-------------------------|---|--|------------|
| <i>C. africana</i> | Hialinos, oblongos a ovais, 10-20 x 5-8 μm | <i>S. bicolor</i> <i>S. verticiliflorum</i> | Brasil |
| <i>C. maximensis</i> | Hialinos, elípticos, 13-20 x 4-6 μm | <i>P. maximum</i> | Brasil |
| <i>C. maximensis</i> | Hialinos, oblongos a levemente alantóides 11-19 x 3-5 μm | <i>B. brizantha</i> <i>B. decumbens</i> | Brasil |
| <i>C. africana</i> * | Hialinos, oblongos a ovais, 9-17 x 5-8 μm | <i>S. bicolor</i> | Zimbábue |
| <i>C. maximensis</i> ** | Hialino, elíptico, 10-30 x 3,5-11 μm | <i>P. maximum</i> | Porto Rico |

* Frederickson et al., 1991

** Theis, 1952

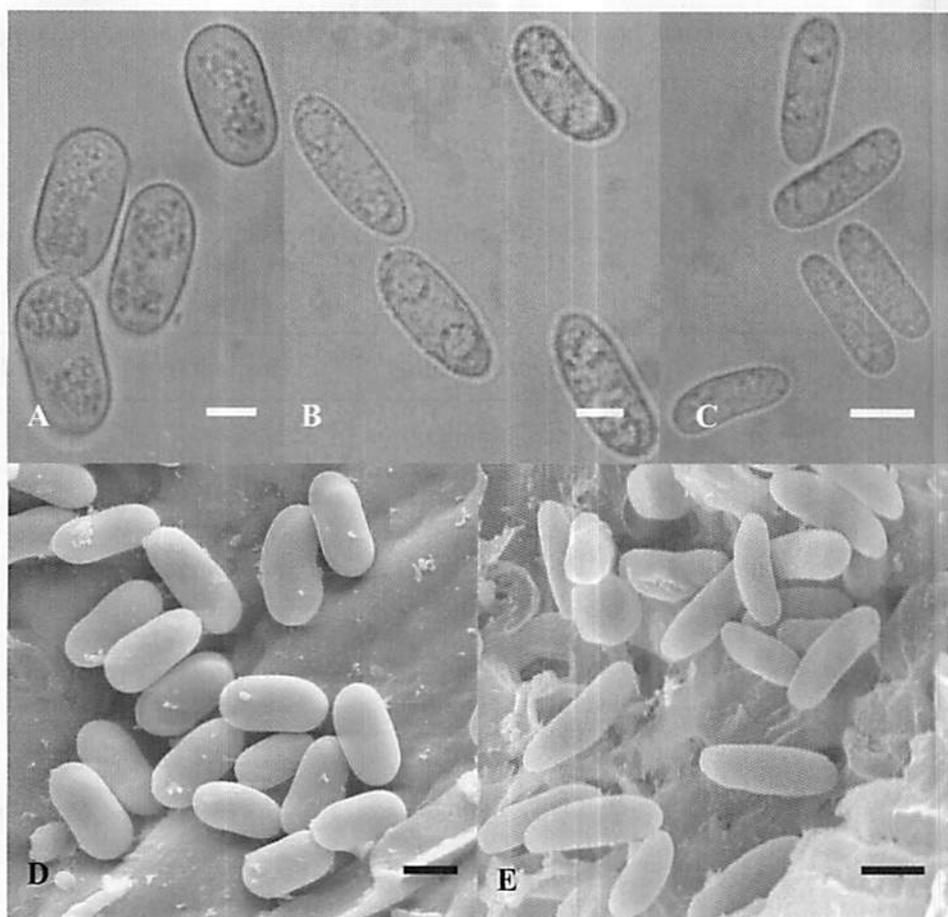


FIGURA 2. A-C – Fotomicrografias de macroconídios de *Claviceps*. A – *C. africana*. B e C – *C. maximensis*. D-E. Eletrofotomicrografias de macroconídios de *Claviceps*. D – *C. africana*, E – *C. maximensis*. Barra = 5 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

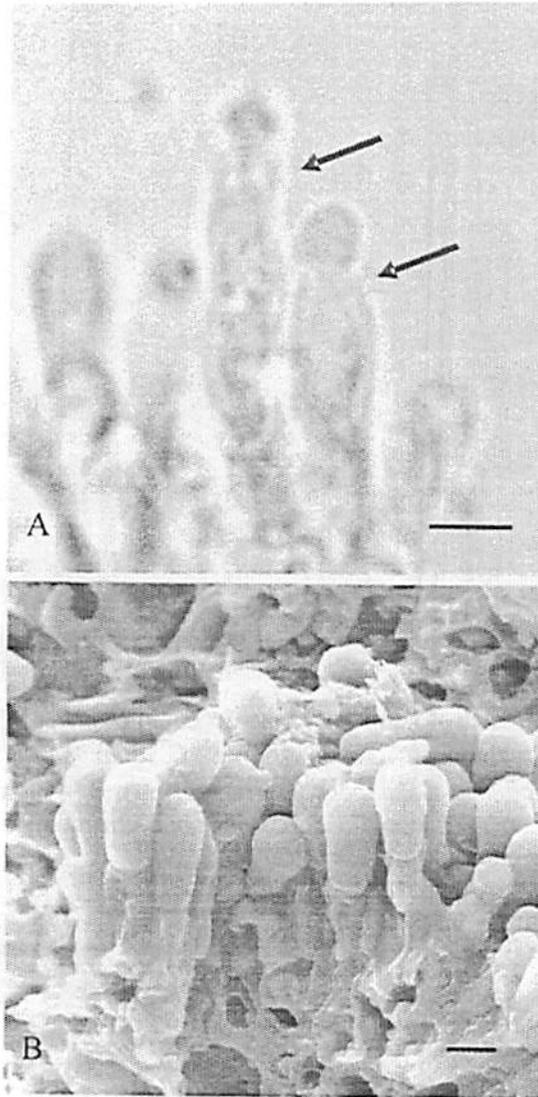


FIGURA 3. A – Fotomicrografias de fiálides (setas) de *Claviceps africana* em ovários de sorgo (Barra = 5 μ m). B Eletrofotomicrografias de um grupo de fiálides, com macroconídios *C. africana*, formando estroma no ovário de sorgo (Barra = 5 μ m). UFLA, Lavras, MG, 2006.

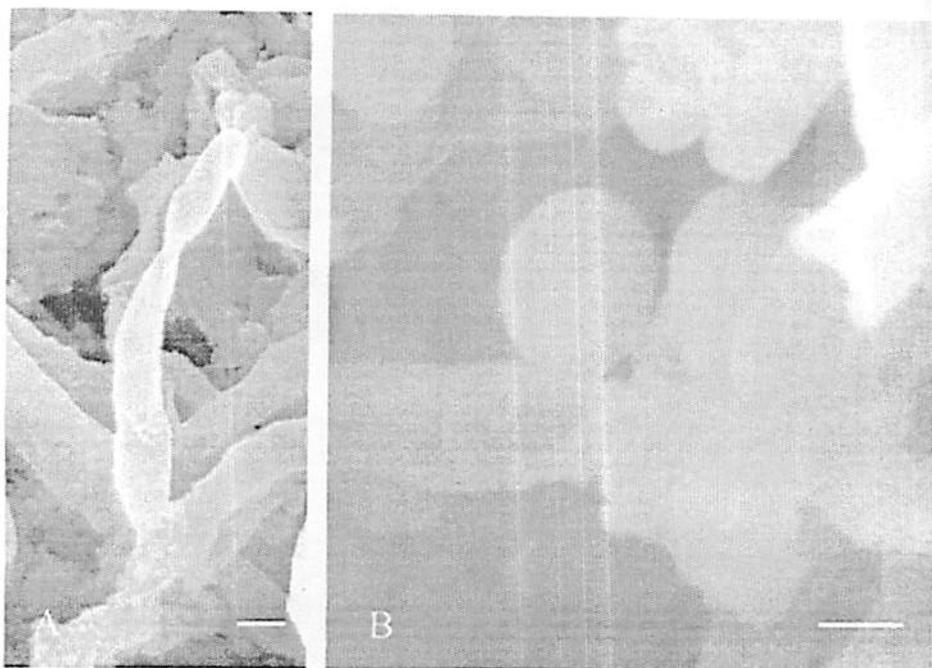


FIGURA 4. A – Eletrofotomicrografias do conidióforo e célula conidiogênica produzindo macroconídio de *C. maximensis* em ovário de *Brachiaria decumbens* (Barra = 5 μ m). B – Eletrofotomicrografias de um microconídio de *C. africana*, em meio de cultura (Barra = 1 μ m). UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a caracterização *in vitro* da fase anamórfica (*Sphacelia*) tornou-se bastante laboriosa visto a constante presença de fungos saprófitas no exsudato produzido pela doença. O isolamento, utilizando as metodologias tradicionalmente descritas para o fungo, não foi bem sucedido. Nas tentativas de isolamento usando os meios Kirshhoff (Kirshhoff, 1929 apud Tudzynski et al., 1995) e T2 (Pazoutová et al., 2000), observou-se uma baixa germinação dos macroconídios, provavelmente devido à alta quantidade de sacarose na composição do meio. Assim, a tentativa de desenvolver um meio de cultura para obter culturas puras de material procedentes do campo teve como princípio a eliminação dos contaminantes.

No gênero *Claviceps*, a caracterização da fase teleomórfica é um critério taxonômico de suma importância usado para separar as espécies e depende da formação de esclerócios. Entretanto, existem dificuldades práticas na observação do teleomorfo, pois a formação desta estrutura é freqüentemente comprometida pela presença de fungos saprófitas (Sangitrao & Bade, 1979), depende de condições climáticas específicas (Luttrell, 1977) e demora significativa na germinação dos esclerócios (Loveless, 1964). Em condições de laboratório, *C. sulcata* demorou cerca de seis meses para iniciar a germinação, enquanto outras espécies podem exigir um período de dormência de até nove meses (Loveless, 1964).

No Brasil, especula-se que a não formação de esclerócios em sorgo pode estar associada a fatores climáticos e à co-evolução com as espécies hospedeiras (Pazoutová, 2003), porém há carência de estudos que esclareçam a relevância da formação da fase teleomórfica no Brasil. No Rio Grande do Sul, foram realizados testes de germinação de amostras de inflorescências contendo

estruturas semelhantes aos esclerócios coletados em lavouras de produção de sorgo, e mesmo após um período incubação de quatro meses não foi possível induzir a germinação destas estruturas e, conseqüentemente, não houve a formação do teleomorfo (Reis et al., 2000).

A caracterização baseada na fase anamórfica (*Sphacelia*) representa uma possibilidade de identificação correta das espécies. Critérios de tamanho, formato e hospedeira foram utilizados por Loveless (1964) na comparação dos macroconídios presentes no exsudato de 34 espécies da família Poaceae, e constatou-se que ocorre grande variação morfológica dos macroconídios em função das espécies hospedeiras. As diferenças morfológicas aqui observadas *in vivo* entre as gramíneas estudadas, tanto na visualização em microscopia ótica quanto em MEV, permitiram uma separação clara entre as espécies de *Claviceps* que ocorrem em *P. maximum*, *Brachiaria* spp. e *Sorghum* spp., mas nota-se uma pequena margem de variação morfológica dentro da mesma espécie quando procedente de diferentes regiões (Theis, 1952; Frederickson et al. 1991; Velázquez-Valle et al., 1998; Komolong et al., 2002; Alderman et al., 2004). Assim, a separação em grupos dentro de subfamílias e tribos sugerida por Loveless (1964) deixa de ser prática na medida em que as condições climáticas, as características do genótipo e as condições de cultivo de plantas hospedeiras podem influenciar os caracteres morfológicos.

Pazoutová et al. (2000) relataram, como uma estratégia eficiente para reduzir a contaminação nos isolamentos, a obtenção do exsudato por meio de uma reinoculação em condições controladas, a partir de material coletado em campo. O procedimento de inoculação nas inflorescências ocorre na fase de antese, cerca de 60 dias após o plantio. Para tanto, é necessário manter plantas de sorgo em casa de vegetação, o que, em alguns casos, não é uma prática viável, dependendo da quantidade de isolados e da época de coleta do material no campo. Esta estratégia tem sido utilizada com freqüência em outros trabalhos,

principalmente nos estudos de biologia molecular, em que é imprescindível o uso de culturas puras para a extração de DNA (Tooley et al., 2000; Tooley et al., 2001; Tooley et al., 2002; Bhuiyan et al., 2003).

O contaminante que ocorreu com maior frequência nos isolamentos foi *A. pullulans*. Este fungo leveduriforme sobrevive na superfície de folhas e frutos vivos. Sua ampla exploração comercial se deve à produção de pululana, um polímero de glicose (α -1,4-glucana) utilizado na produção de filme de cobertura para a indústria de alimentos (Deacon, 1997). Além disso, estudos confirmaram seu potencial como agente de controle biológico de doenças de pós-colheita (Schena et al., 1999; Ippolito & Nigro, 2000; Castoria et al., 2001; Schena et al., 2003). *In vitro*, o isolado LS-30 de *A. pullulans* teve atividade antagonista significativa contra os seguintes fungos: *Botrytis cinerea* Pers, *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. e *Aspergillus niger* Tiegh em uvas de mesa. O principal mecanismo desta ação antagonista foi a competição por nutriente (Castoria et al., 2001). Isolados endofíticos de *A. pullulans*, obtidos de cereja, foram eficientes no controle de podridões pós-colheita de cereja (*B. cinerea*) e podridões em frutos de uva Itália (*Monilinia laxa* Aderh. & Ruhland) Honey (Schena et al., 2003).

Outros fungos presentes na mela já foram testados como agentes de controle biológico por apresentarem alterações no desenvolvimento de *C. africana*. *Epicoccum nigrum* Link e *Penicillium citrinum* Sopp inibiram a germinação *in vitro* dos macroconídios, e em casa de vegetação reduziram significativamente a severidade da doença (Bhuiyan et al., 2003). Os dois gêneros mais comuns associados à mela do sorgo são *Fusarium* e *Epicoccum* (= *Cerebella*), que já foram relatados como micoparasitas de *Claviceps* spp. (Mower et al. 1975a; Sangitrao & Bade, 1979; Bandyupadhyay et al., 1998).

Bogo et al. (2004) relataram que a formação do conídio secundário ocorre em função da baixa concentração de açúcares que atuavam como

inibidores. Nos mecanismos de formação da mela, elucidados por Mower & Hancock (1975a), foram observadas as transformações bioquímicas e biofísicas deste processo. A sacarose, carregada para o ovário, é convertida pelo fungo em monossacarídeos por meio de duas enzimas (β -D-fructofuranosidase e β -D-*trans*-fructofuranosidase). O fungo utiliza a glicose como fonte de alimento e a frutose é eliminada em forma de dissacarídeos (fructosil-manitol) ou trissacarídeos (difructosil-manitol). Uma alta concentração destes oligossacarídeos diminui o potencial de água, secando o exsudato. Observou-se uma alta concentração de sacarose na composição do meio Kirchoff (200g/L) e no meio T2 (100g/L). Assim, a sacarose parece favorecer no início da germinação dos macroconídios; porém, após a formação das primeiras hifas cessa o crescimento e não ocorre o desenvolvimento da colônia. A menor concentração de sacarose no meio MIC 10 (20g/L) viabilizou tanto a germinação dos macroconídios quanto o crescimento da colônia, conforme demonstrado por Bogo et al. (2004).

7 CONCLUSÕES

1. Os fungos associados à mela do sorgo interferem substancialmente no isolamento da fase anamórfica (*Sphacelia*) de *Claviceps*.
2. Os fungos filamentosos presentes no exsudato são potencialmente agentes de controle da doença, visto a inibição da germinação dos conídios de *Claviceps* em meio de cultura.
2. Foi estabelecida uma metodologia para o isolamento de *Claviceps*. O meio de cultura denominado MIC, associado aos antibióticos gentamicina e tetraciclina, propiciou o crescimento eficiente do fungo em cultura, bem como o controle de contaminantes.
3. A morfologia dos macroconídios, a presença de microconídios e as características das colônias do fungo em meio de cultura da espécie isolada do sorgo são semelhantes às descritas na literatura para *C. africana*, o que sugere ser a mesma espécie.
4. As espécies isoladas de *P. maximum* e *Brachiaria* spp. apresentaram características morfológicas que as aproximam de *C. maximensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERMAN, S.C.; HALSE, R.R.; WHITE, J.F. A reevaluation of the host range and geographical distribution of *Claviceps* species in the United States. **Plant Disease**, v.88, p.63-81, 2004.

BANDYOPADHYAY, R. e tal. Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. **Plant Disease**, v.82, p.356-367, 1998.

BANDYOPADHYAY, R. et al. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi*. **Phytopathology**, v.80, p.812-818, 1990.

BHUIYAN, S.A. et al. Evaluation of potential biocontrol agents against *Claviceps africana* in vitro and in vivo. **Plant Pathology**, v.52, p.60-67. 2003.

BOGO, A.; MANTLE, P.G.; HARTHMANN, O.E.L. Screening of sweet sorghum accessions for inhibition of secondary sporulation and saccharide measurements in honeydew of *Claviceps africana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.86-90, 2004.

CASTORIA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, v.22, p.7-17, 2001.

CHINNADURAI, G.; GOVINDASWAMY, C.V.; RAMARKISHNAN, K. Studies on the effect of stigmatic exudates on sorghum on the parasitism of *Sphacelia sorghi* McRae. **Phytopathology Z**, v.69, p.56-63, 1970.

DEACON, J.W. **Modern mycology**. 3rded. UK. Blackwell Science, 1997.

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, 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, p.1101-1107, 1991.

GONZÁLEZ, H.H.L., MARTINEZ, E.J.; RESNIK, S.L. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. **Mycopathologia**, v.139, p.35-41, 1997.

IPPOLITO, A., NIGRO, F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Crop Protection**, v.19, p.715-723, 2000.

KOMOLONG, B. et al. Identity and genetic diversity of the sorghum ergot pathogen in Australia. **Australian Journal Agricultural Research** v.53, p.621-628, 2002.

KULKARNI, B.G.P., SESHADRI, V.S.; HEGDE, R.K. The perfect stage of *Sphacelia sorghi* McRae. **Mysore Journal Agricultural Science**, v.1, p.286-289, 1976.

LOVELESS, A.R. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. **Transactions of the British Mycological Society**, v.47, p.205-213, 1964

LUTTRELL, E.S. The disease cycle and fungus-host relations in Dallisgrass ergot. **Phytopathology**, v.67, p.1461-1468, 1977.

MANTLE, P.G. Production of ergot alkaloids *in vitro* by *Sphacelia sorghi*. **Journal of General Microbiology**, v.75, p.275-281, 1973.

MCLAREN, N.W.; FLETT, B.C. Use of weather variables to quantify sorghum ergot potencial in South Africa. **Plant Disease**, v.82, p.26-29, 1998.

MCLAREN, N.W.; WEHNER, A. Relationship between climatic variables during early flowering of sorghum and the incidence of sugary disease caused by *Sphacelia sorghi*. **Journal Phytopathology**, v.130, p.82-88, 1990.

MOWER, R.L.; HANCOCK, J.G. Mechanism of honeydew formation by *Claviceps* species. **Canadian Journal of Botany**, v.53, p.2826-2834, 1975a.

MOWER, R.L.; HANCOCK, J.G. Sugar composition of ergot honeydews. **Canadian Journal of Botany**, v.53, p.2813-2825, 1975b.

PAZOUTOVÁ, S. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In.: WHITE JR.. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts**. New York: M. Dekker, 2003. p.329-354.

PAZOUTOVÁ, S. et al. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease**, v.84, p.437-442, 2000.

REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; CASA, R. T. Doença açucarada do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.3, p. 249-490, Sept. 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, p.463, 1996.

RIET-CORREA, F. et al. Intoxicação por *Claviceps paspali* em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, p.59-65, 1983.

RYLEY, M.J. et al. An overview of the biology of sorghum ergot. In.: LESLIE, J.F. (Ed.). **Sorghum and millet diseases**. Iowa: Iowa State, 2002. p.141-150.

SANGITRAO, C.S.; BADE, G.H. Meteorological factors associated with honey dew development and sclerotial stage in sorghum ergot. **Sorghum Newsletter**, v.22, p.107-108, 1979.

SCHENA, L. et al. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. **Postharvest Biology and Technology**, v.17, p.189-199, 1999.

SCHENA, L. et al. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.209-220, 2003.

THEIS, T. An undescribed species of ergot on *Panicum maximum* Jacq. Var. common guinea. **Mycologia**, v.44, p.789-794, 1952.

TOOLEY, P.W.; GOLEY, E.D.; CARRAS, M. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from United States, Mexico, Africa, Australia, India and Japan. **Plant Disease**, v.86, p.1247-1252, 2002.

TOOLEY, P.W. et al. Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. **Mycologia**, UK, v.93, n.3, p.541-551, May/ June 2001.

TOOLEY, P.W. et al. Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.10, p.1126-1130, Oct. 2000.

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

TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B. Molecular aspects of host-pathogen interactions and ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps*. In.: WHITE JR. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts**. New York: M. Dekker, 2003. p.445-473.

TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B; OESER, B. *Claviceps purpurea*. In.: KOHMOTO, K. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Eukaryotes. Kidlington, UK: Elsevier Science, 1995. v.2, p.161-187.

VELÁQUEZ-VALLE, R. Spread of ergot of sorghum (*Claviceps africana*) in central Mexico. **Plant Disease**, v.82, n.4, p.447, Apr. 1998.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Claviceps* spp. EM SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS
FORRAGEIRAS

1 RESUMO

CHAVES, Zuleide Martins. Caracterização molecular da fase anamórfica (*Sphacelia* spp.) de espécies de *Claviceps* de sorgo e outras gramíneas forrageiras. 2006, p. 61-86, Tese (Doutorado em Agronomia-Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.⁵

Análises de seqüências de regiões específicas do genoma, tais como a região ITS (internal transcribed spacer) do DNA ribossômico (rDNA), têm sido usadas para elucidar as relações de filogenia e evolução do gênero *Claviceps*. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo caracterizar isolados de *Claviceps*, encontradas em sorgo e outras gramíneas forrageiras no Brasil, usando seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA. Fragmentos de aproximadamente 300 pb da região ITS 1 do rDNA de 15 isolados de *Claviceps* (9 de *S. bicolor*, 1 de *S. verticilliflorum*, 2 de *P. maximum* cv Colônia, 2 de *B. decumbens* e 1 de *B. brizantha*) foram amplificados por PCR usando os primers ITS1 e ITS2, purificados e seqüenciados. Seqüências de isolados de sorgo apresentaram cerca de 50 pares de bases a mais que as de isolados de *Brachiaria* spp. e *P. maximum*. Com base em análise comparativa em banco de dados, usando o programa BLAST, as seqüências de isolados de sorgo possuem 97 a 99% de identidade com *C. africana* (AF281176) procedente de Nebraska/EUA, enquanto que as de isolados de *P. maximum*, *B. brizantha* cv. Marandu e de *B. decumbens* cv. Basilisk compartilham, respectivamente, 97%, 98% e 94% de identidade com seqüências de *C. maximensis*. A árvore filogenética gerada no programa PAUP 4.0b usando o critério de máxima parcimônia agrupou os isolados de *Claviceps* em dois grupos distintos, onde os isolados obtidos de *P. maximum* e *Brachiaria* spp. agruparam com isolados de *C. maximensis* procedentes da América do Sul, e todos os isolados de sorgo agruparam consistentemente com os isolados de *C. africana* de outras regiões do mundo. Com base nestas evidências, os isolados estudados pertencem a duas espécies distintas e foram identificados como *C. africana* (isolados de *Sorghum*) e como *C. maximensis* (isolados de *P. maximum* e *Brachiaria* spp.).

⁵ Comitê Orientador: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Orientador), Carlos R. Casela – EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-orientador)

2 ABSTRACT

CHAVES, Zuleide Martins. **Molecular characterizat on of species of *Claviceps* from sorghum and other forage grasses.** 2006, p. 61-86, Thesis (Doctorate in Agronomy-Phytopathology), Federal University of Lavras, Lavras MG.⁶

Sequence analyses from genomic specific regions, such as internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA, have been used to elucidate the phylogenic and evolutionary relationships of the genus *Claviceps*. Thus, the objective of this work was to perform the molecular characterization of isolates of *Claviceps*, obtained from sorghum and other forage grasses in Brazil, by using sequencing the region ITS 1 of the ribossomic DNA (rDNA). Twenty isolates of *Claviceps* were studied, isolated from *S. bicolor*, *S. verticilliflorum*, *P. maximum* cv. Colonião, *B. decumbens* and *B. brizantha*. Fragments of about 300 pb were PCR-amplified using primers ITS1 and ITS2, purified and sequenced. Sequences from sorghum isolates are about 50 bp more in length than those from *Brachiaria* spp and *Panicum maximum*. Based on comparative analysis with sequences deposited in the GenBank database using the software BLAST, sequences from sorghum isolates share 97 to 99% of sequence identity with *C. africana* (AF281176) originated from Nebraska/EUA, whereas sequences from *P. maximum*, *B. brizantha* cv. Marandu and *B. decumbens* cv. Basilisk isolates share 97%, 98% and 94% of sequence identity, respectively, with *C. maximensis*. A phylogenetic tree generated in PAUP 4.0b10 software using maxima parsimony criteria divided our isolates in two major groups. Isolates from *Brachiaria* spp and *Panicum maximum* comprise the one cluster grouping together with *C. maximensis* species originated from South America, while all sorghum isolates make up a cluster together with *C. africana* from other regions of the world. These results provided evidences of the existence of distinct species of *Claviceps* on the plants investigated, which were identified as *C. africana* for sorghum and *C. maximensis* for *Brachiaria* spp and *Panicum maximum* isolates.

⁶ Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Adviser), Carlos R. Casela – EMBRAPA Milho e Sorgo (Co-Adviser)

3 INTRODUÇÃO

As relações de filogenia e evolução do gênero *Claviceps* ainda não foram totalmente elucidadas, em especial entre as espécies que ocorrem em sorgo e em gramíneas (Pazoutová et al., 2000; Pazoutová, 2001; Pazoutová, 2003).

Recentemente, a análise de seqüências específicas do DNA, tais como a região do íntron 3 do gene da β -tubulina e do íntron 4 do gene EF-1 α , permitiram observar diferenças significativas entre os isolados de *Claviceps* provenientes das mais diversas regiões do mundo (Tooley et al., 2001). Em comparações de seqüências de regiões específicas do rDNA foi observada a existência de três espécies de *Claviceps* em sorgo, *C. africana*, *C. sorghi* e *C. sorghicola* (Pazoutová, 2001).

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA é uma das mais utilizadas nos estudos de evolução, sistemática e para o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico molecular de patógenos de importância agrícola e na ecologia de fungos (Bruns et al., 1991; Bowman et al., 1992; Gardes & Bruns, 1993; Swann & Taylor, 1993; Sreenivasaprasad et al., 1996). Esta região consiste de três genes principais que codificam as subunidades ribossomais: a maior (LSU - *large subunit*), a menor (SSU - *small subunit*) e a 5,8 S. Estes genes são separados por espaçadores denominados ITS e os grupos de genes completos se repetem em *tandem* ao longo do cromossomo. Os grupos de genes ribossomais são separados por seqüências espaçadoras intergênicas (IGS - *Intergenic Spacers*) (Figura 1). Os genes são considerados regiões conservadas e as regiões espaçadoras, polimórficas. Tais características viabilizaram o desenvolvimento de sondas e *primers*, os quais amplificam regiões específicas com uma margem maior de confiança (Brigde, 2002).

A compreensão das relações evolucionárias entre as espécies de *Claviceps*, bem como a sua distribuição nas diferentes hospedeiras, serve de suporte para a correta identificação do patógeno e o conseqüente estabelecimento das relações entre espécies isoladas no Brasil e aquelas das demais regiões do mundo, além de inferir sobre as prováveis fontes da introdução deste patógeno no Brasil. Diante desta questão, o presente trabalho teve como principal objetivo realizar a caracterização molecular de *Claviceps* spp., isolada de sorgo e de outras gramíneas forrageiras, no Brasil, por meio do seqüenciamento da região ITS do DNA ribossômico (rDNA).

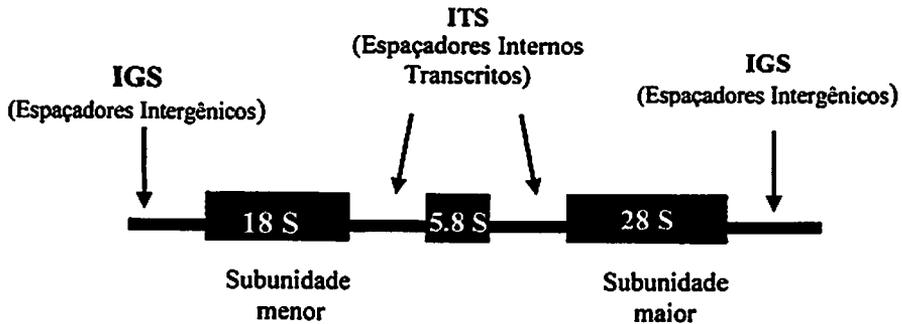


FIGURA 1. Representação esquemática da organização do DNA ribossômico (rDNA). UFLA, Lavras, MG, 2006.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Solos e no Laboratório de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

4.1 Isolamento e cultivo dos isolados

Foram utilizados 15 isolados, sendo nove provenientes de *S. bicolor*, um de *S. verticilliflorum*, dois de *P. maximum* cv. Colônia, dois de *B. decumbens* e um de *B. brizantha* (Tabela 1A). As culturas puras dos isolados foram cultivadas em meio líquido para obtenção de biomassa. Como o meio MIC 10 foi o que proporcionou melhor crescimento das colônias, ele foi utilizado como meio líquido, ou seja, sem a adição de ágar na sua composição. Fragmentos das colônias foram colocados em frascos de 250 mL com o meio de cultura MIC 10 e incubados a 25 °C, sem agitação, por 10 dias. Após este período, as colônias foram filtradas em gaze esterilizada para remover o excesso de meio líquido.

4.2 Extração de DNA

O DNA de micélio fresco do fungo foi extraído usando o método fenol-clorofórmio descrito por Lee & Taylor (1990), modificado por Pazoutová (2000). O micélio foi macerado em nitrogênio líquido, colocado em microtubos de 1500 µL e a ele adicionados 400 µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, SDS 3%, β-mercaptaetanol 1%, pH 7,2), o qual foi incubado por 1 hora a 65 °C. Os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 16.000g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 400 µL de clorofórmio/fenol (1v:1v), sendo a mistura homogeneizada por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos a 8200g. A fase

aquosa foi transferida para outro microtubo, ao qual foram, posteriormente, adicionados 400 μ L de clorofórmio e o material, centrifugado por 10 minutos a 8200g. A etapa de adição de clorofórmio foi repetida três vezes para retirar o excesso de polissacarídeos. Novamente, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo, ao qual foram adicionados 400 μ L de isopropanol; em seguida, o material foi armazenado a -20°C por no mínimo 1 hora. Após este período, os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 16.000 $\times g$ e o “pellet”, lavado com etanol 70%, seco em centrífuga a vácuo por 5 minutos e ressuspendido em 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8).

A concentração do DNA foi estimada por comparação com DNA λ em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

4.3 Amplificação da região ITS 1 por PCR

A região ITS 1 do rDNA, de aproximadamente 300 pb, foi amplificada usando os *primers* ITS1 e ITS2 (Figura 2) (White et al., 1990). As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycle) programado para uma desnaturação inicial de 1 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (1' - 94 °C, 1' - 50 °C, 1'30'' - 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Cada 25 μ L de reação continha tampão de PCR 1 X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 5 μ M de cada *primer*; 10 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas e estocadas no sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene). Os fragmentos amplificados foram separados do gel e purificados utilizando o kit de extração de DNA a partir de gel da Qiagen, segundo recomendações do fabricante.

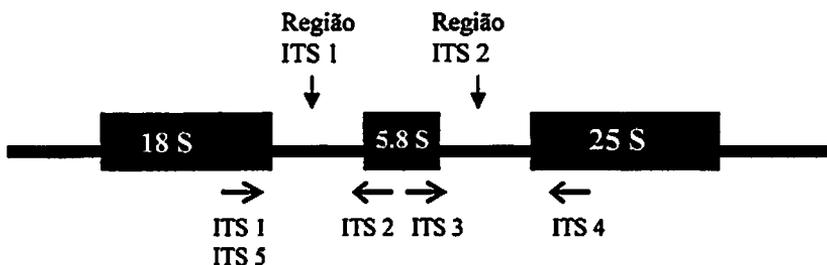


FIGURA 2. Representação esquemática das regiões ITS 1 e 2 e da posição dos *primers* usados para amplificar estas regiões. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.4 Seqüenciamento e análise da região ITS 1

O seqüenciamento do DNA foi realizado no seqüenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems Hitachi) utilizando os *primers* ITS1 e ITS2, separadamente, e o kit "Big Dye Terminator" v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com recomendações do fabricante. As seqüências de DNA foram alinhadas usando o Programa CAP EST Assembler (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>). As seqüências consenso foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa Blast N (Altschul et al., 1997) (Tabela 1).

O programa utilizado para calcular a porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA foi o LALING (<http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi>).

4.5 Análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos da região ITS1 rDNA de *Claviceps* spp. disponíveis no banco de dados do NCBI foram utilizadas para comparações e na construção das árvores filogenéticas, e *Epichlõe festucae* (AJ488497) foi usado como *outgroup* (Tabela 1).

Cada seqüência foi editada manualmente, usando o programa BioEdit (Hall, 1999), e posteriormente os alinhamentos múltiplos de seqüências nucleotídicas de espécies de *Claviceps* foram efetuados usando o programa Clustal W, versão 1.82 (Thompson et al., 1994). Depois de alinhadas, as seqüências de nucleotídeos foram corrigidas manualmente no programa BioEdit.

As árvores filogenéticas de máxima parcimônia foram construídas usando o pacote PAUP 4.0b10, por meio de buscas heurísticas com os modo TBR (Tree Bisection Reconnection) e MULTREES selecionados. Nas buscas heurísticas, os *gaps* foram tratados como quinto caractere (*newstate*). Nas análises de *bootstrap* foram utilizadas 1000 repetições (Swofford, 2003).

TABELA 1. Espécies de *Claviceps* utilizadas nas análises filogenéticas e respectivos acessos no NCBI. UFLA, Lavras, MG, 2006.

| Espécies | Hospedeira | Origem | Nº de acesso no <i>GenBank</i> |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| <i>C. africana</i> | - | Bolívia | AJ011590 |
| <i>C. africana</i> | Strain T10 | Austrália | AJ011783 |
| <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Nebraska, EUA. | AF281176 |
| <i>C. africana</i> | - | Índia | AJ011784 |
| <i>C. fusiformis</i> | <i>Pennisetum</i> sp | - | AJ133392 |
| <i>C. maximensis</i> | <i>Brachiaria</i> sp | Campo Grande, Brasil. | AJ133403 |
| <i>C. maximensis</i> PM | <i>P. maximum</i> | Chaco, Paraguai | AJ133396 |
| <i>C. sorghi</i> | <i>S. bicolor</i> | Índia | AJ306621 |
| <i>C. sorghicola</i> | <i>Sorghum bicolor</i> | Japão | AJ011591 |
| <i>C. sorghicola</i> | <i>Sorghum bicolor</i> | Kanto, Japão | AJ133397 |
| <i>Claviceps</i> sp. SG | <i>Setaria geniculata</i> | Passo Fundo, Brasil | AJ133402 |
| <i>Epichloë festucae.</i> | <i>Festuca ampla</i> | Espanha | AJ488497 |

5 RESULTADOS

5.1 Estudo das seqüências da região ITS e análise filogenética

A amplificação da região ITS 1 do rDNA, utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 2, resultou em bandas de tamanho variado. Para os isolados de sorgo, os fragmentos foram de aproximadamente 250 pares de bases (pb), e para os isolados de *Brachiaria* e *P. maximum*, de cerca de 214 pb (Figura 3).

Na comparação entre as seqüências consenso obtidas neste estudo comparadas e as seqüências depositadas no *GenBank*, verificou-se que os nove isolados de *S. bicolor* e um isolado de *S. verticilliflorum* resultaram em 97 a 99 % de identidade com *C. africana* (AF281176) procedente de Nebraska, EUA. Nos isolados de *P. maximum*, *B. brizantha* cv. Marandu e de *B. decumbens* cv. Basilisk, as porcentagens de identidade com *C. maximensis* Theis (AJ133396) proveniente de Chaco, no Paraguai, foram de 97, 98 e 94 %, respectivamente.

No alinhamento das seqüências de nucleotídeos, foi observada variabilidade nas seqüências de bases entre os isolados. Foi constatada, nos isolados identificados como *C. maximensis*, uma lacuna nas seqüências de nucleotídeos, entre os nucleotídeos 75 e 151, em comparação com *C. africana*. Já nos isolados de *C. sorghicola* observou-se uma inserção de 10 a 20 nucleotídeos quando comparado com a seqüência dos isolados de *C. africana*.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos, pelo programa LALING, revelou uma alta porcentagem de identidade, variando de 98 a 100 % entre os isolados de *C. africana* de sorgo. O isolados CML 438 de Sete Lagoas e CML 435 de Lavras, ambos de *S. bicolor*, apresentaram 98,8 % de identidade. Os isolados CML 437 de *S. verticilliflorum* e CML 438, ambos de Sete Lagoas, mas de espécies diferentes, apresentaram 99,2 % de identidade entre si. Os isolados

do Brasil apresentaram alta porcentagem de identidade com *C. africana* dos Estados Unidos e da Bolívia, entre 98 % e 99,1 %, respectivamente (Tabela 2).

Entre os isolados das gramíneas forrageiras, os resultados foram semelhantes. O isolado CML 436, obtido de *P. maximum*, de Sete Lagoas, e o isolado CML 448, de Montes Claros, apresentaram 96,7 % de identidade entre si. O isolado CML 446, obtido de *Brachiaria*, de Uberlândia, apresentou 98,6 % e 98,1 % de identidade, respectivamente, com os isolados CML 444, obtido de *B. decumbens*, e CML 445, obtido de *B. brizantha*, ambos de Sete Lagoas. Mesmo colonizando hospedeiros diferentes, os isolados CML 436 e CML 446 tiveram 97,7 % de identidade entre si. Entre os isolados CML 446 e CML 448, a porcentagem de identidade foi de 98,6 % (Tabela 2).

O isolado CML 435 de sorgo, coletado no Brasil, quando comparado com o isolado de *C. sorghicola*, proveniente do Japão, apresentou a mais baixa porcentagem de identidade (80,3 %) (Tabela 2). Portanto, esses isolados, embora colonizem o mesmo hospedeiro (sorgo), parecem pertencer a espécies diferentes, o que foi confirmado pelas características morfológicas do teleomorfo, do anamorfo e da sintomatologia da doença.

Os resultados da análise de máxima parcimônia mostraram uma clara separação entre os isolados de *Claviceps* de sorgo e das gramíneas forrageiras, formando dois grupos distintos (Figura 4).

A árvore de máxima parcimônia dos isolados de *Claviceps* em sorgo apresentou três agrupamentos: o grupo de *C. sorghicola*, o grupo de *C. maximensis* e o grupo de *C. africana*. O primeiro grupo contém apenas o isolado de *C. sorghicola* proveniente do Japão. No segundo grupo estão os isolados de *C. maximensis*. Neste grupo, três espécies da América do Sul, anamorfas de *Claviceps* sp. SG (de *Setaria geniculata* de Passo Fundo, Brasil), *C. maximensis* PM (de *P. maximum* do Chaco, Paraguai) e *C. maximensis* (de *Brachiaria* sp. de Campo Grande, Brasil), agruparam-se com as espécies de *Claviceps* isoladas P.

maximum (CML 436 e CML 448) e os isolados provenientes de *B. decumbens* cv. Basilisk (CML 444), *B. brizantha* cv. Marandu (CML 445) e *B. decumbens* (CML 446).

Todos os isolados de *C. africana* foram agrupados no terceiro grupo. Todos os isolados de *C. africana* obtidos de sorgo agruparam-se consistentemente com os isolados de *C. africana* de outras regiões do mundo. Entre os isolados do Brasil, não foi detectada nenhuma variação genética quando comparadas sequências da região ITS 1 do rDNA. Estes isolados agruparam-se com um apoio de 100 % na análise de *bootstrap*. *Claviceps fusiformis* ficou separado, juntamente com *C. sorghi*, proveniente da Índia.

Na árvore de máxima parcimônia, gerada apenas com isolados de *C. maximensis*, observou-se a formação de dois grupos. Um grupo com os isolados de *Brachiaria* (CML 444, CML 445 e CML 446) e outro grupo com os isolados de *P. maximum* (CML 436 e CML 448) (Figura 5). Entretanto, eles não se agruparam quanto à origem geográfica.

Não foi observada correlação entre a origem geográfica e os hospedeiros dos isolados do Brasil, tanto no padrão de bandas (Figura 3) quanto no alinhamento e na árvore de máxima parcimônia (Figura 4).

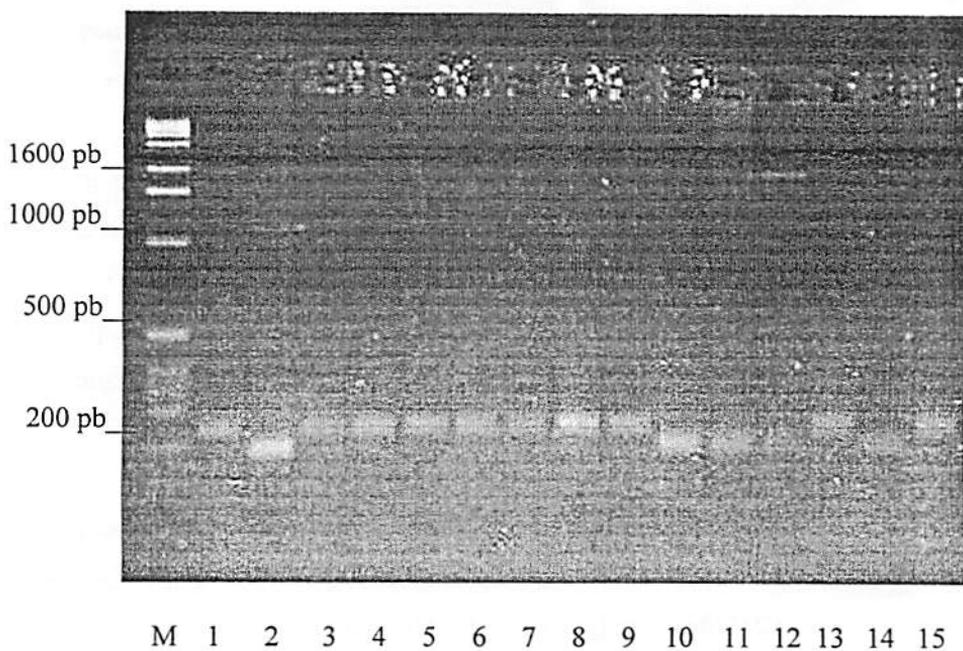


FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose da região ITS do rDNA amplificada por PCR dos isolados de *Claviceps* de sorgo, *P. maximum* e *Brachiaria*. M: marcador 1kb ladder (Os números de 1 a 15 referem-se aos isolados listados na Tabela 1A). UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 2. Comparação das seqüências da região ITS 1 do rDNA de *Claviceps* entre as espécies estudadas e de espécies depositadas no NCBI. UFLA, Lavras, MG, 2006.

| Seqüência 1 | Seqüência 2 | Identidade (%) |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| CML 437 - <i>C. africana</i> | CML 438 - <i>C. africana</i> | 99,2 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | <i>Claviceps africana</i> (Bolivia) | 99,1 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | CML 438 - <i>C. maximensis</i> | 98,8 |
| CML 446 - <i>C. maximensis</i> | CML 444 - <i>C. maximensis</i> | 98,6 |
| CML 446 - <i>C. maximensis</i> | CML 448 - <i>C. maximensis</i> | 98,6 |
| CML 446 - <i>C. maximensis</i> | CML 445 - <i>C. maximensis</i> | 98,1 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | <i>Claviceps africana</i> (EUA) | 98,0 |
| CML 436 - <i>C. maximensis</i> | CML 446 - <i>C. maximensis</i> | 97,7 |
| CML 436 - <i>C. maximensis</i> | CML 448 - <i>C. maximensis</i> | 96,7 |
| CML 436 - <i>C. maximensis</i> | <i>Claviceps maximensis</i> | 93,3 |
| CML 436 - <i>C. maximensis</i> | <i>Claviceps</i> SG | 90,4 |
| <i>Claviceps africana</i> (EUA) | <i>Claviceps sorghi</i> | 88,1 |
| <i>Claviceps africana</i> (EUA) | <i>Claviceps sorghicola</i> | 85,1 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | <i>Claviceps fusiformis</i> | 80,8 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | <i>Claviceps sorghicola</i> | 80,3 |
| CML 436 - <i>C. maximensis</i> | <i>Claviceps africana</i> (EUA) | 72,5 |
| CML 435 - <i>C. africana</i> | CML 436 - <i>C. maximensis</i> | 72,0 |

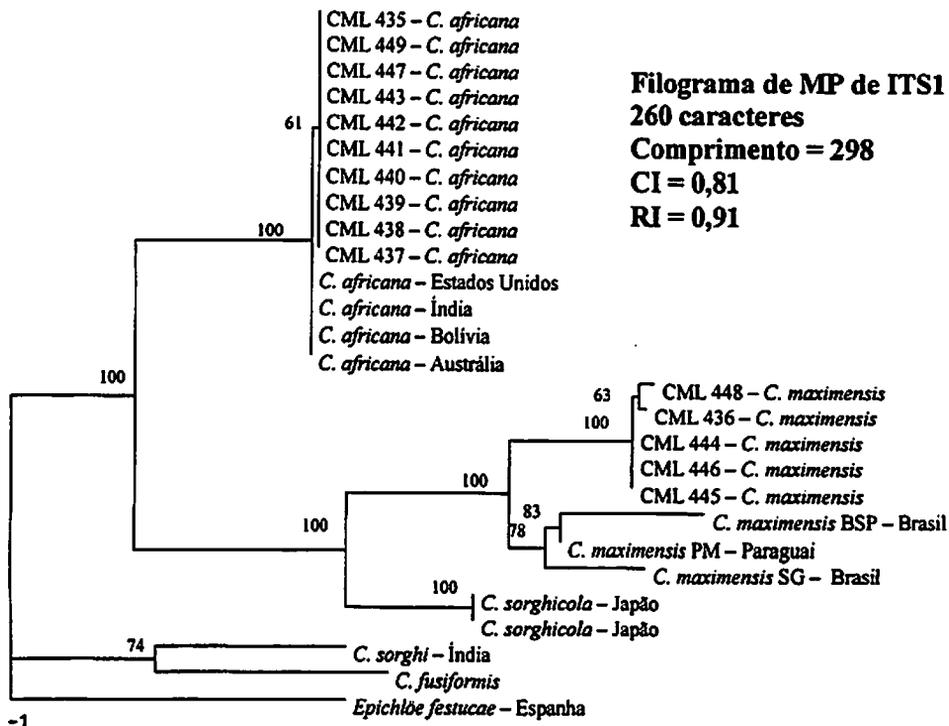


FIGURA 4. Árvore filogenética de máxima parcimônia para a região ITS 1 do rDNA de espécies de *Claviceps*, incluindo isolados provenientes de *B. brizantha*; *B. decumbens*, *P. maximum*, *S. bicolor* e *S. verticilliflorum*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. Abreviações das coleções de culturas: CML= Coleção Micológica de Lavras. UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 DISCUSSÃO

Os estudos de genética de populações do patógeno da doença açucarada do sorgo e outras gramíneas ainda são poucos e se concentram em avaliar as diferenças entre as espécies de regiões específicas do mundo (Pazoutová et al., 2000; Tooley et al. 2002; Komolong et al. 2002).

Algumas técnicas moleculares utilizadas nos estudos de variabilidade genética dentre e entre espécies de *Claviceps* em sorgo, como seqüenciamento de regiões específicas do DNA, análise de microsatélite e análise de AFLP, verificaram uma pequena variação intra-específica de *C. africana*, porém não o suficiente para determinar taxa inferiores à espécie. Todavia, os resultados foram consistentes para diferenciação ao nível de espécies (Pazoutová et al., 2000; Tooley et al., 2001; Komolong et al. 2002).

Os dados obtidos por meio de amplificação e seqüenciamento da região ITS 1 do rDNA permitiram confirmar a identidade do agente etiológico da doença açucarada no Brasil como *C. africana*. As seqüências depositadas no banco de dados do NCBI proporcionaram um alinhamento das seqüências consenso dos isolados de *S. bicolor* e *S. verticilliflorum* com identidade variado de 97 a 99 %, o que representa a variabilidade genética em termos da região ITS para este gênero. Das outras duas espécies que ocorrem em sorgo, *C. sorghi* é considerada endêmica na Índia (Bandyopadhyay et al., 1998), enquanto *C. sorghicola* é restrita ao Japão (Tsukiboshi et al., 1999).

O alto grau de identidade dos isolados do Brasil com os isolados dos Estados Unidos apóiam a hipótese de que *C. africana* tenha se disseminado por todo o continente Americano.

Os isolados provenientes de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *P. maximum* obtiveram uma porcentagem de identidade entre 97 e 99 % com a espécie *C.*

maximensis, a qual foi relatada por Theis (1952) ocorrendo em *P. maximum* var. Guiné, em Porto Rico. Os espécimes utilizados nas comparações, provenientes de *P. maximum* do Paraguai, e um isolado de *Setaria geniculada*, do Brasil, foram recentemente identificados ao nível de espécie como *C. maximensis* (Pazoutová & Bogo, 2002). A diferença no tamanho das bandas (Figura 3) ocorreu, principalmente, em função de uma diferença de aproximadamente 50 pb entre as espécies *C. africana* e *C. maximensis*. Quando as seqüências foram alinhadas, nos isolados das gramíneas forrageiras foi observado que a região ITS 1 de *C. maximensis*, por ser mais curta, formou uma lacuna. As espécies com a região ITS 1 mais longa parecem ter preenchido as lacunas com seqüências inteiramente diferentes. Estas diferenças na região ITS nas espécies de *Claviceps* podem ser resultado de eventos independentes ao longo da evolução (Pazoutová 2001, 2003).

Os relatos da ocorrência de espécies de *Claviceps* em *P. maximum* e em *Brachiaria* no Brasil são confusos e não revelam a correta identidade do patógeno; alguns foram identificados apenas quanto ao gênero (Ferreira & Casela, 1995; Fernandes et al., 1995; Alderman, 2003). Dentre as espécies relatadas nestas gramíneas, a mais comum é *C. purpúrea*; entretanto, as características morfológicas estão em desacordo com as encontradas nos isolados aqui estudados e verifica-se uma preferência deste patógeno por climas temperados (Alderman, 2003). Relatos de *C. sulcata* em *B. decumbens* geraram uma grande confusão quanto à identidade do patógeno. Tendo em vista as dificuldades de isolar o patógeno, a cultura foi confundida com a de *A. pullulans*, contaminante freqüente nos isolamentos (Fernandes et al., 1995).

Em todos os trabalhos moleculares diferenciando isolados de *C. africana* foram utilizados isolados de diferentes regiões do mundo, incluindo África, Austrália, Bolívia, Estados Unidos, Índia, Japão, México e Porto Rico (Tooley et al., 2001; Komolong et al., 2002; Pazoutová et al. 2000; Pazoutová, 2001),

porém observou-se uma carência de isolados do Brasil. Por ser este um país de grande extensão territorial e de variadas condições climáticas, é de fundamental importância um detalhado conhecimento da biologia de *C. africana*, principalmente no tocante à variabilidade genética de populações desta espécie, para que estas informações sejam utilizadas em programas de melhoramento genético de sorgo visando a resistência à doença.

A árvore de máxima parcimônia dos isolados de *Claviceps* em sorgo apresentou três agrupamentos: o grupo de *C. sorghicola*, o grupo de *C. maximensis* e o grupo de *C. africana*. O primeiro grupo foi formado apenas com os isolados de *C. sorghicola* provenientes do Japão; esta espécie foi descrita recentemente, porém restrita este país (Tsukiboshi et al., 1999). A morfologia de *C. sorghicola* a difere das demais espécies que ocorrem em sorgo, principalmente pela cor do estroma e pela estrutura do *capitulum*. Há diferenças também com relação ao anamorfo, pois os macroconídios são menores, mais ou menos a metade do tamanho dos macroconídios das outras espécies, e foi relatada a formação de microconídios e conídios secundários. A análise da região ITS 1 do rDNA também foi eficaz em separar *C. sorghicola* das outras espécies de *Claviceps* por possuir um número maior de pares de base e diversas dissimilaridades nas seqüências (Pazoutová, 2001).

O segundo grupo, formado por isolados identificados como *C. maximensis*, apresentou a maior diversidade. A caracterização molecular de *C. maximensis* ainda permanece confusa (Pazoutová, 2003). Este patógeno foi relatado em *S. geniculata*, *P. maximum* e *Brachiaria* sp.; entretanto, a ausência de marcadores morfológicos, principalmente a formação do teleomorfo, não permitiu estabelecer a sua correta posição taxonômica. Recentemente Pazoutová (2003) sugeriu que os isolados de *Brachiaria* sp., anteriormente identificados como *C. sulcata*, pertençam a *C. maximensis*.

Todos os isolados de *C. africana* foram agrupados no terceiro grupo. Não foi observada nenhuma variação genética entre os isolados de *C. africana* de *S. bicolor* e *S. verticilliflorum*, os quais se agruparam com um apoio de 100 % na análise de *bootstrap*. A análise de seqüências nucleotídicas da região ITS 1 rDNA não se mostrou sensível para separação intra-específica em *Claviceps* spp. Altos valores de similaridade foram observados entre isolados de *C. africana* na Austrália por meio de análise de RAF (Radiolabelled Amplified DNA fingerprint). Dos 110 isolados estudados de *C. africana*, foi possível separar os isolados em dois grupos distintos. O alto nível de diversidade genética dos isolados de *C. africana* na Austrália foi inesperado, visto que o patógeno foi relatado a pouco menos de 10 anos nesta região (Komolong et al., 2002). Para estudos de variabilidade genética de *C. africana* no Brasil é necessária uma amostragem mais representativa das diversas regiões do país em que o sorgo é cultivado, devendo ser realizados novos estudos empregando técnicas específicas para o estudo populacional, como o AFLP.

A distribuição das espécies de *Claviceps* em subfamílias de Gramineae é considerada bastante desigual, o que sugere a possibilidade de não ter ocorrido uma co-evolução do fungo com as suas respectivas hospedeiras (Pazoutová, 2001). Relatos da distribuição biogeográfica de *Claviceps* sugeriram a América do Sul como provável centro de origem do gênero, sendo que as primeiras espécies teriam surgido nos antecessores das gramíneas panicóides em um ambiente de clima úmido e quente (Langdon, 1954 apud Pazoutová, 2001). É importante salientar que algumas espécies de *Claviceps*, dentre elas *C. gigantea*, *C. africana*, *C. sorghi*, *C. maximensis* e *C. phalaridis*, são altamente adaptadas a condições de semi-árido, porém não desenvolveram resistência a condições de frio (Pazoutová, 2001).

No Brasil, a caracterização de *C. africana*, bem como da espécie que ocorre em gramíneas forrageiras, foi 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 foram importantes para a confirmação da etiologia do patógeno do sorgo, diferenciando-o das espécies que ocorrem em outras gramíneas e sua distribuição sob diferentes condições climáticas.

FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Ocorrência de *Claviceps sorghi*, agente causal da doença ergot no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.302, 1995.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes; application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p.113-118. 1993

HALL, T.A.. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.

KOMOLONG, B. et al. Identity and genetic diversity of the sorghum ergot pathogen in Australia. **Aust. J. Agric. Res.** v.53, n.6, p.621-628, 2002.

MOWER, R.L.; HANCOCK, J.G. Sugar composition of ergot honeydews. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.53, n.12, p.2813-2825, Dec. 1975.

ODVODY, G. Control and management of sorghum ergot. In: DAHLBERG, J.A. (Ed.). **Proceedings for the Status of Sorghum Ergot in North America**. Corpus Christi, Texas: 1998. p.24-26.

PAZOUTOVÁ, S. The evolutionary strategy of *Claviceps*. In.: WHITE JR. (Ed.). **Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.329-354.

PAZOUTOVÁ, S. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. **Mycological Research**, UK, v.105, n.3, p. 275-283, Mar. 2001.

PAZOUTOVÁ, S. et al. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.4, p.437-442, Apr. 2000.

PAZOUTOVÁ, S.; BOGO, A. *Heteropogon triticeus*, a new host of *Claviceps sorghi* in India. *Journal Phytopathology*, v.150, n.4, p.196-198, Apr. 2002.

REIS, E.M.; BLUM, M.M. C.; CASA, R.T. Doença açucarada do sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, n.3, p.249-490, Sept. 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*, Saint Paul, v.80, n.4, p.463, Apr. 1996.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, v.45, p.650-655, 1996

SWANN, E.C.; TAYLOR, J.W. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia*, v.85, p.923-936, 1993.

SWOFFORD, D.L. PAUP *, **Phylogenetic analysis using parsimony (* and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusetts. 2003

THEIS, T. An undescribed species of ergot on *Panicum maximum* Jacq. Var. common guinea. *Mycologia*, v.44, p.789-794, 1952.

THOMPSON, J.D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.

TOOLEY, P.W. et al. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from United States, Mexico, Africa, Australia, India and Japan. *Plant Disease*, Saint Paul, v.86, n.11, p.1247-1252, Nov. 2002.

TOOLEY, P.W. et al. Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. *Mycologia*, UK, v.93, n.3, p.541-551, May/June 2001.

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

TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B; OESER, B. *Claviceps purpurea*. In.: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R.P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. *Eukaryotes*. Kidlington: Elsevier Science, 1995. v.2, p.161-187.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; SNINSKY, D.H.; WHITE T.J. (Ed.). **PCR Protocols**. London: Academic, 1990. p.315-322.

CAPÍTULO 4

PATOGENICIDADE DA FASE ANAMÓRFICA (*Sphacelia* spp.) DE ESPÉCIES DE *Claviceps* EM SORGO E OUTRAS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO BRASIL

3 INTRODUÇÃO

Diversas gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil são exóticas e dentre elas destacam-se espécies de *Brachiaria*, *Paspalum*, *Pennisetum* e *Andropogon* (Zimmer & Euclides Filho, 1997).

Espécies do gênero *Claviceps* (anamorfo *Sphacelia*) mostram especificidade a gramíneas e causam problemas como redução na qualidade dos grãos em diversas de importantes culturas como trigo, cevada, centeio, milho, sorgo e milheto (Willingale et al., 1986), bem como nas forrageiras *Cenchrus ciliaries* L., *C. setiger* Vahl, *P. maximum* e *Ischaemum pilosum* (Klein ex Willd.) Wight (Mughogho, 1986). No Brasil, vários são os capins são afetadas pela da mela, dentre eles *P. maximum*, *C. ciliaries*, *P. glucum*, *B. brizantha*, *B. mutica* e *Lolium multiflora* Lam (Fernandes et al., 1995; Pinto et al., 1997; Mendes et al., 1998).

A fase anamórfica *Sphacelia* é vital para a disseminação e epidemiologia da doença. Entretanto, diferenças na morfologia e nas dimensões dos conídios de *Sphacelia* não são suficientes para caracterizar e identificar as diversas espécies que colonizam estas hospedeiras (Loveless, 1964). Como nas condições brasileiras a formação e germinação dos esclerócios ainda permanecem desconhecidas, é preciso recorrer a outros procedimentos para a caracterização e distinção das espécies envolvidas nos patossistemas do Brasil. Os sintomas da doença açucarada do sorgo, em sua fase anamórfica, são semelhantes aos que ocorrem em praticamente todas as gramíneas forrageiras.

Testes de inoculação cruzada podem ser realizados para verificar a gama de hospedeiros do patógeno utilizando a fase anamórfica (Futrell & Webster, 1966; Chinnadurai & Govindaswamy, 1970; Sangitrao & Moghe, 1995; Bandyopadhyay et al., 1998; Tsukiboshi et al., 1999; Muthusubramanian et al.,

2005). Embora esta fase represente um papel importante no ciclo de vida destes fungos e na epidemiologia da doença, os testes não são conclusivos quanto à taxonomia do patógeno. Como nem sempre podem ser estabelecidas as devidas conexões com a fase teleomórfica (Hodge, 2003) e não há informações suficientes sobre a especificidade, os resultados podem levar a interpretações errôneas quanto à identidade do patógeno (Fernandes et al., 1995).

A infecção por *Sphacelia* foi observada em *Andropogon carissosus* L var. *Mollicomus*, *A. annulatus* Forssk, *Pennisetum alopecuroides* Nees ex Steud e *Aschaemum pilosum*, com posterior formação de esclerócios do fungo em *P. alopecuroides* (Barbara & Mantle, 1980).

Sphacelia sorghi, proveniente de *S. verticilliflorum* e *S. bicolor*, foi eficiente na infecção quando realizadas as inoculações cruzadas. Porém, não se verificaram sintomas da doença quando este patógeno foi inoculado em milho, *Cenchrus*, capim colonião (*P. maximum* cv. Colonião) e milheto (*P. glaucum*) (Ferreira & Casela, 1998).

Sphacelia provenientes de capim colonião, coloniãozinho, *Brachiaria* spp., bengo (*Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf) e milheto não foram capazes de infectar *S. bicolor*. Entretanto, verificou-se a reciprocidade do poder infectivo entre os isolados de *Sphacelia* sp de colonião, coloniãozinho e bengo, indicando tratar-se de uma mesma espécie ou de espécies distintas compatíveis, porém patogênicas às gramíneas estudadas (Ferreira & Casela, 1998).

Recentemente, na Índia, foi avaliada a susceptibilidade de hospedeiras alternativas a *C. sorghi* e a *C. africana*. As espécies *Panicum*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Andropogon*, *Dichanthium*, *Chrysopogon*, *Iseilema*, *Bothriochloa* e *Chloris* não foram susceptíveis à infecção por estas duas espécies de *Claviceps*. Entretanto, foi observada a infecção por *S. verticilliflorum*, *S. halepense*, *S. versicolor* e *P. glaucum* (Muthusubramanian et al., 2005).

Diante destas afirmações, este trabalho teve o intuito de esclarecer a patogenicidade de isolados *Claviceps* spp. do Brasil provenientes de sorgo e de diferentes gramíneas forrageiras, por meio de ensaios de inoculação cruzada. Além disso, visou verificar as potenciais fontes de inóculo e as possíveis hospedeiras alternativas de *C. africana*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e no laboratório de Resistência de Plantas a Doenças e em casas de vegetação da EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas.

4.1 Coleta dos isolados

Entre os meses de fevereiro de 2003 e julho de 2004, foram coletadas panículas de sorgo *P. maximum* cv Colômbio e *B. brizantha* com sintomas de doença açucarada em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). As panículas foram secas em temperatura ambiente, etiquetadas com data, local de coleta e hospedeiro e armazenadas em sacos de papel em geladeira a 4 °C. Essas panículas foram utilizadas para a produção das suspensões de inóculo.

4.2 Produção dos inóculos

Para a obtenção dos inóculos, as panículas foram imersas em 500 mL de água esterilizada por dois minutos para a dispersão dos esporos. A suspensão foi filtrada em duas camadas de gaze e diluída para uma concentração de 10^6 conídios/mL (Frederickson et al., 1989).

4.3 Inoculação

Por ocasião da antese, a suspensão foi aplicada nas inflorescências de cada gramínea utilizando um pulverizador manual de 1L. As pulverizações foram realizadas por três dias seguidos. Para evitar a contaminação cruzada, as

panículas foram protegidas com sacos de papel do início da formação da inflorescência até o momento da inoculação.

4.4 Plantas testadas

As espécies de gramíneas forrageiras testadas foram *Andropogon gayanus*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *Paspalum atratum* cv. Pojuca, *P. maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* cv. Tanzânia, *P. glaucum* cv. BR 1501 e *S. bicolor* cultivares BR 001A, BR 001B, BR 700, 0303001, BRS 308, DKB 75 e DKB 599. As sementes de sorgo foram fornecidas pela Embrapa Milho e Sorgo e as sementes de forrageiras, pela Empresa Naterra Sementes de Ribeirão Preto/SP.

Cada espécie foi semeada em recipientes com 20 kg de solo, com cinco repetições para cada hospedeira. Das espécies de sorgo e de milho foram plantadas cinco plantas por vaso. As gramíneas forrageiras foram plantadas a lanço. Nas condições climáticas oferecidas, o sorgo floresceu entre 60 a 70 dias após a germinação, o milho floresceu 70 dias e as gramíneas forrageiras levaram, em média, 120 dias para florescer (Figura 1).

4.5 Local e época

Os experimentos foram realizados em três locais e épocas distintos. Na Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG, no período de novembro de 2003 a abril de 2004, foram realizadas, em casa de vegetação, as inoculações de *C. africana* nas gramíneas forrageiras e nas cultivares sorgo BR001A, BR 001B e BR 700. No mesmo local, no período de março a julho de 2004, foram inoculados, em casa de vegetação, *C. africana* e *C. maximensis* em *P. maximum*, *B. brizantha* e nas cultivares de sorgo BR 001B, 0303001, BRS 308, DKB 75 e DKB 599. No Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – Lavras, MG, foram inoculados *C. africana* e *C. maximensis* em *P. glaucum* e nas cultivares de sorgo BR 001A, BR 001B e BR 700, em câmara de

crescimento com temperatura de $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12/12 horas. Para este teste, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o estágio de emborrachamento. Posteriormente, as panículas em formação foram cobertas com sacos de papel e os recipientes, transferidos para a câmara de crescimento; as panículas foram mantidas neste local até a fase de antese, quando foram realizadas as inoculações.

4.6 Avaliação

Em sorgo, a incidência da doença foi avaliada contando o número de panículas que apresentavam sintomas da doença. A avaliação foi diária; durante 20 dias foram avaliadas 25 panículas (cinco por vaso). Nas gramíneas forrageiras foram avaliadas 10 panículas por vaso, num total de 50 panículas de cada espécie. A avaliação foi diária, durante 30 dias.

4.7 Reisolamento

Para confirmar a identidade do patógeno, foram preparadas lâminas das gotas do exsudato *in natura*. Com uma alça de platina retirou-se um pouco do exsudato das panículas infectadas, o qual foi colocado na lâmina com lactoglicerol e coberto com uma lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de luz. Gotas do exsudato *in natura* foram plaqueadas em meio MIC 10 com antibiótico e incubadas em temperatura ambiente e foi observado o crescimento das colônias por 15 dias, cumprindo-se os postulados de Koch.

5 RESULTADOS

Os resultados da inoculação de *C. africana* em sorgo e em gramíneas forrageiras foram obtidos entre novembro de 2003 e abril de 2004. Todas as cultivares de sorgo inoculadas com *C. africana* desenvolveram a doença. A produção do exsudato, sintoma característico da doença, foi observada a partir do sexto dia após a inoculação nos floretes superiores da panícula. Após o 12º dia, a panícula já estava completamente coberta pela mela. Não foi observada a formação de esclerócios em nenhuma dos cultivares de sorgo. A observação diária seguiu até o 30º dia, quando foi observada a presença massiva de fungos saprófitas recobrimdo toda a panícula. Não foram observados sintomas da doença em nenhuma das panículas das gramíneas forrageiras, fato que evidencia que a espécie *C. africana* não causou infecção nessas plantas.

A inoculação de *C. africana* em *B. decumbens* e *P. maximum* não levou à produção de sintomas nas plantas. Entretanto, quando as mesmas plantas foram inoculadas com *C. maximensis*, os sintomas da doença se manifestaram. Todas as cultivares de sorgo testadas tiveram 100% de incidência quando inoculadas com *C. africana*, porém não ocorreu infecção quando inoculadas com *C. maximensis* (Tabela 1).

No teste de patogenicidade realizado em condições controladas em câmara de crescimento, *C. maximensis* não foi capaz de induzir sintomas de mela nos cultivares de sorgo e *P. glaucum*. A inoculação com *C. africana* provocou sintomas em plantas de sorgo, mas não em *P. glaucum* (Tabela 2).

Em câmara de crescimento, com a temperatura média de 15 °C, foi evidenciada uma redução no desenvolvimento das plantas e na formação das panículas. Conseqüentemente, houve demora na produção de pólen nos

cultivares de sorgo BR 001A e BR 700, o que favoreceu a infecção. O exsudato foi observado no quinto dia após a infecção.

TABELA 1. Incidência da mela em plantas de sorgo e gramíneas forrageiras inoculadas com *C. africana* e *C. maximensis* em casa de vegetação, no período de novembro/2003 a abril/2004, EMBRAPA – Sete Lagoas/MG. UFLA, Lavras, MG, 2006.

| Hospedeiras | <i>C. africana</i> | <i>C. maximensis</i> ⁽¹⁾ | <i>C. maximensis</i> ⁽²⁾ |
|--|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>B. decumbens</i> | - | + | + |
| <i>P. maximum</i> | - | + | + |
| <i>S. bicolor</i> BR 001B | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> 0303001 ^(a) | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> BRS 308 | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> DKB 75 | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> DKB 599 | + | - | - |

⁽¹⁾: Material proveniente de *B. decumbens*.

⁽²⁾: Material proveniente de *P. maximum* cv Colônia.

^(a): híbrido experimental, material da Embrapa Milho e Sorgo

- sem presença de sintomas da doença;

+ presença de sintomas da doença, produzindo mela 6 dias após a inoculação.

TABELA 2. Incidência da mela em plantas de sorgo e gramíneas forrageiras inoculadas com *C. africana* e *C. maximensis* em câmara de crescimento com temperatura de 15 °C, no período de agosto a dezembro de 2004, Lavras/MG. UFLA, Lavras, MG, 2006.

| Hospedeiras | <i>C. africana</i> | <i>C. maximensis</i> ⁽¹⁾ | <i>C. maximensis</i> ⁽²⁾ |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Pennisetum glaucum</i> | - | - | - |
| <i>Sorgum bicolor</i> BR 001A | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> BR 001B | + | - | - |
| <i>S. bicolor</i> BR 700 | + | - | - |

⁽¹⁾: Material proveniente de *B. decumbens*. ⁽²⁾: Material proveniente de *P. maximum*.

- não apresentou sintomas da doença; + apresentou sintomas da doença

6 DISCUSSÃO

A variação de hospedeira é uma das características que auxilia no reconhecimento e na identificação das espécies de *Claviceps*. Das espécies de *Claviceps*, a mais conhecida é *C. purpure*; há registro de sua ocorrência em mais de 400 espécies de plantas hospedeiras, porém todas restritas à subfamília Pooideae. Entre suas hospedeiras estão incluídos de cereais de importância econômica até gramíneas forrageiras. Em contrapartida, há espécies que parecem estar restritas a uma única espécie de hospedeira, como, por exemplo, *C. amamiensis*, que é conhecida parasitando somente *Digitaria microbachne* Henr. no Japão (Tanda, 1992).

O clima é outro fator importante na sobrevivência das espécies de *Claviceps*. Em climas temperados, espécies como *C. purpurea*, *C. paspali* e *C. zizaniae* requerem exposição à baixa temperatura para germinarem. Já nos trópicos semi-áridos, as espécies são adaptadas a temperaturas mais quentes, como exemplo o caso de esclerócios de *C. fusiformes*, que necessitam de temperaturas entre 20-37°C para germinarem (Prakash et al., 1987).

A distribuição original de espécies de *Claviceps* foi severamente afetada nos últimos cem anos devido à transferência de sementes entre os continentes. Como exemplo desse fato pode ser verificada a introdução de *P. maximum* na América do Sul, o qual se adaptou rapidamente às condições brasileiras (Parsons, 1972), bem como de outras espécies como as braquiárias, *Paspalum* e o sorgo.

Dentre as espécies de gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil estão os gêneros *Brachiaria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* e *Andropogon*, escolhidos para realizar os testes de patogenicidade da fase anamórfica (*Sphacelia*) da espécie de *Claviceps* aqui isolada de sorgo. Na literatura há relatos de que

Brachiaria é colonizada por *C. sulcata*, *C. hirtella* e *C. maximensis*. Já em *P. maximum* ocorrem três espécies: *C. maximensis*, *C. balansoides* e *C. uleana*. (Alderman, 2003; Pazoutová, 2001). No presente estudo foi confirmada apenas a presença de *C. maximensis* em ambas as hospedeiras.

Nos testes para confirmar a patogenicidade de *C. africana* observou-se que não houve o desenvolvimento de sintomas da doença em nenhuma das panículas das gramíneas forrageiras inoculadas com este fungo. Embora *C. africana* tenha sido relatado causando infecção em milho (*P. glaucum*) (Frederickson & Mantle, 1996), isso não foi confirmado no nosso experimento, confirmando os dados do Japão (Tsukiboshi et al., 2001). Entretanto, deve-se ressaltar que Bandyopadhyay et al. (1998) observaram que o desenvolvimento da doença é influenciado por fatores climáticos como temperatura e umidade.

As panículas de sorgo inoculadas com *C. africana* apresentaram os primeiros sintomas entre o quinto e o sétimo dia após inoculação. Ao final do 12º dia, 100% das panículas inoculadas estavam infectadas. Entretanto, nenhuma das cultivares de sorgo inoculados com *C. maximensis* apresentou sintomas de mela. A não patogenicidade de *C. africana* em gramíneas forrageiras e de *C. maximensis* em sorgo indica a presença de espécies distintas.

Embora muitas espécies de gramíneas forrageiras, especialmente as de *Brachiaria* e *Panicum*, cresçam nas adjacências das lavouras de sorgo, os dados aqui apresentados demonstram que elas não estão envolvidas no ciclo de vida do patógeno que causa mela do sorgo. Isso leva a crer que também não servem de reservatório do fungo nos períodos de ausência da sua hospedeira. Entretanto, Pazoutová (2000) discutiu a possibilidade de coinfeção com consequente hibridização entre espécies selvagens e espécies introduzidas, a exemplo do que aconteceu com *C. sorghi*, que ficou restrita à Índia e pode ter sido substituída por *C. africana* nos demais continentes.

Testes de inoculação cruzada confirmaram a patogenicidade de *C. africana* e *C. sorghi* em diferentes espécies de sorgo, muitos deles selvagens (Futrell & Webster, 1966; Chinnadurai & Govindaswamy, 1970; Sangitrao & Moghe, 1995; Bandyopadyay et al., 1998; Tsukiboshi et al., 1999; Muthusubramanian et al., 2005). Muthusubramanian et al. (2005) verificaram que espécies de *Panicum*, *Brachiaria Cenchus*, *Andropogon*, *Dichanthium*, *Chrysopogon*, *Iseilema*, *Bothriochloa* e *Chloris* foram imunes diante da inoculação com *C. sorghi* e *C. africana*, porém observaram a incidência de mela em *S. verticilliflorum*, *S. halepense*, *S. versicolor* e *P. glaucum*, causada pela infecção destes patógenos. Isso reforça a hipótese de que uma das prováveis fontes de inóculo pode, realmente, estar nas espécies de sorgo selvagem.

Entretanto, para se detectarem os hospedeiros responsáveis pela transmissão da doença de uma estação de cultivo para outra, são necessários mais estudos levando em conta a variabilidade de *C. africana* e das espécies que ocorrem em gramíneas forrageiras.

7 CONCLUSÕES

1. Nas condições em que foram realizadas as inoculações cruzadas, *C. africana* não causou sintomas de mela nas seguintes gramíneas forrageiras: *A. gayanus*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *Paspalum atratum* cv. Pojuca, *Panicum maximum* cv. Mombaça, *P. maximum* cv. Tanzânia e *P. glaucum*.
2. A espécie de *Claviceps* que ocorre naturalmente em *B. brizantha*, *B. decumbens* e em *P. maximum* não causou sintomas de mela em sorgo nem em *P. glaucum*.
3. A mela do sorgo está associada a *C. africana*, porém nas outras gramíneas avaliadas, o agente etiológico da doença foi identificado como *C. maximensis*.
4. Os dados apresentados indicam que outras gramíneas forrageiras não funcionam como reservatório de inóculo da mela do sorgo.
5. As espécies de sorgo selvagem, dentre elas *S. verticilliflorum*, que crescem nas adjacências das lavouras de sorgo, provavelmente constituem uma importante fonte de inóculo da mela do sorgo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERMAN, S.C. Diversity and Speciation in *Claviceps*. In.: WHITE JR. (Ed.). *Clavicipitalean Fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts*. New York: Marcel Dekker, 2003. p.195-245.

BANDYOPADHYAY, R. et al. Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Disease*, Saint Paul, v.82, n.4, p.356-367, Apr. 1998.

BARBARA, S.I.; MANTLE, P.G. Host infection by *Claviceps purpurea*. *Transaction Br. Mycol. Soc.*, London, v.75, n.1, p.77-90, 1980.

CHINNADURAI, G.; GOVINDASWAMY, C.V.; RAMARKISHNAN, K. 1970. Studies on the effect of stigmatic exudates os sorghum on the parasitism of *Sphacelia sorghi* McRae. *Phytopathology Z.*, v.69, n.1, p.56-63, 1970.

FERNANDES, C.D.; FERNANDES, A.T.F.; BEZERRA, J.L. "Mela": uma nova doença em sementes de *Brachiaria* spp, no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.20 p.501-503, 1995.

FERREIRA, A.S.; CASELA, R.C. Identificação de hospedeiros alternativos de *Sphacelia sorghi* (*Claviceps africana*) agente causal da doença açucarada do sorgo (*Sorghum bicolor*). In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, v.22., p.158, 1998

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*, Great Britain, v.93, n.4, p.497-502, Apr. 1989.

FUTTRELL, M.C.; WEBSTER, O.J. Host range and epidemiology of the sorghum ergot organism. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v.50, n.11, p.828-831, Nov. 1966.

HODGE, K.T. Clavicipitaceous anamorphs. In.: WHITE JR. et al. (Ed.). **Clavicipitalean Fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts**. New York: M. Dekker, 2003. p.75-123.

LOVELESS, A.R. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. **Transactions of the British Mycological Society**, v.47, p.205-213, 1964.

MENDES, M.A.S. et al. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenagen, 1998. 555p.

MUGHOGHO, L.K. Ergot. In.: FREDERIKSEN, R.A. (Ed.). **Compendium of sorghum disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1986. p.39-40.

MUTUSUBRAMANIAN, V. et al. Inoculated host range and effect of host on morphology and size of macroconidia produced by *Claviceps africana* and *Claviceps sorghi*. **Journal Phytopathology**, v.153, p.1-4, 2005.

PARSONS, J.J. Spread of African grasses to the American Tropics. **Journal Range Managt.**, v.25, p.12-17, 1972.

PAZOUTOVÁ, S. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. **Mycological Research**, UK, v.105, n.3, p. 275-283, Mar. 2001.

PAZOUTOVÁ, S. et al. Relations among sorghum ergot isolates from the Americas, Africa, India, and Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.4, p.437-442, Apr. 2000.

PINTO, N. F. J. de A.; FERREIRA, A.S.; CASELA, R.C. Ergot (*Claviceps africana*) ou doença açucarada do sorgo. EMBRAPA Milho e Sorgo, 1997. (Circular Técnica, 23).

PRAKASH, S.H. et al. Stimulation of the sclerotial germination of *Claviceps fusiformis*. *Geobios*, v.14, p.244-246, 1987.

TANDA, S. Mycological studies on the ergot in Japan (XXVII). An undescribed species is *Claviceps* on *Digitária*. *Journal Agricultural Science*, Tokyo Nogyo Daigaku, v36, p.182-188, 1992.

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

WILLINGALE, J.; MANTLE, P.G.; THAKUR, R.P. Postpollination stigmatic constriction, the basis of ergot resistance in selected lines of pearl millet. *Phytopathology*, v.76, p.536-539, 1986.

ZIMMER, A.H.; EUCLIDES FILHO, K. As pastagens e a pecuária de corte brasileira. In: **SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUCAO ANIMAL EM PASTEJO**, 1997, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV, 1997. p.349-379.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre as características morfológicas e biológicas das espécies de *Claviceps* que infectam sorgo e suas relações com outras gramíneas forrageiras no Brasil são escassos, principalmente se comparados aos realizados com espécies de outras regiões do mundo e com espécies que ocorrem em potenciais hospedeiras alternativas. Portanto, o principal foco desta pesquisa foi o desenvolvimento de estudos na tentativa de ampliar os conhecimentos sobre a biologia deste fungo.

Em um primeiro momento, o controle químico foi realizado com sucesso; entretanto, seu papel no manejo da doença pode ser otimizado quando associado a outras estratégias, principalmente o desenvolvimento de cultivares resistentes à doença. Outro fator limitante está na ausência de estudos sobre a variabilidade genética do patógeno no Brasil. Neste processo, a caracterização molecular pode facilitar a verificação de variabilidade intra-específica e contribuir esclarecendo os mecanismos de interação planta-patógeno.

Embora a fase anamórfica seja de grande importância na epidemiologia da doença, ela não permite a correta identificação das espécies de *Claviceps*, sendo necessário observar a morfologia da fase teleomórfica, a composição bioquímica dos alcalóides ou a análise de seqüências específicas do DNA genômico.

A influência da temperatura já foi bem esclarecida para *C. purpurea*, a qual, embora seja um patógeno cosmopolita, necessita de temperaturas baixas para estimular a formação da fase teleomorfa. Entretanto, há outras espécies melhor adaptadas ao clima tropical. Acredita-se que as espécies de *Claviceps*, que ocorrem em *Brachiaria* e em *Panicum*, possam ser espécies distintas das que ocorrem em outras gramíneas.

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A. Isolados de *Claviceps* usados neste estudo, com respectivas hospedeiras e origem geográfica.

| Nº | Isolado | Espécie | Hospedeira | Origem geográfica |
|----|---------|----------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1 | CML 435 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Lavras – MG |
| 2 | CML 436 | <i>C. maximensis</i> | <i>P. maximum</i> cv Colônia | Sete Lagoas – MG |
| 3 | CML 437 | <i>C. africana</i> | <i>S. verticilliflorum</i> | Sete Lagoas – MG |
| 4 | CML 438 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> BR001 | Sete Lagoas – MG |
| 5 | CML 439 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Sete Lagoas – MG |
| 6 | CML 440 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> BR700 | Sete Lagoas – MG |
| 7 | CML 441 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Sete Lagoas – MG |
| 8 | CML 442 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Sete Lagoas – MG |
| 9 | CML 443 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Sete Lagoas – MG |
| 10 | CML 444 | <i>C. maximensis</i> | <i>B. decumbens</i> cv. Basilisk | Sete Lagoas – MG |
| 11 | CML 445 | <i>C. maximensis</i> | <i>B. brizantha</i> cv Marandu | Sete Lagoas – MG |
| 12 | CML 446 | <i>C. maximensis</i> | <i>B. decumbens</i> | Uberlândia – MG |
| 13 | CML 447 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Lavras – MG |
| 14 | CML 448 | <i>C. maximensis</i> | <i>P. maximum</i> cv Colônia | Montes Claros – MG |
| 15 | CML 449 | <i>C. africana</i> | <i>S. bicolor</i> | Lavras – MG |

TABELA 2A. Composição dos meios de cultura.

| | Meio de cultura | Composição |
|------|--------------------|--|
| MIC1 | Meio Kirchhoff* | 100 g sacarose; 10 g L-asparagina; 0,1 g extrato de levedura; 0,25 g K ₂ HPO ₄ ; 0,25 g MgSO ₄ 7 H ₂ O ; 0,02 g FeSO ₄ 7 H ₂ O; 0,015 g ZnSO ₄ 7 H ₂ O; 0,12 g KCl; 1 g Ca (NO ₃) ₂ 4 H ₂ O; 20g de ágar; pH 5,2. |
| MIC2 | MSB | 5 g Tween 80; 5 mL K ₂ HPO ₄ sol. 10%; 2 mL MgSO ₄ 7 H ₂ O sol. 10%; 1 mL NaCl sol. 10%; 2 mL CaCl ₂ . 2 H ₂ O sol. 1%; 2 mL de solução de micronutrientes para NFb; 2 mL de bromotimol sol. 0.5% em 0.2 N de KOH; 4 mL de FeDTA sol. 1.64% ou 0.4g de FeSO ₄ 7 H ₂ O; 4,5 g KOH; Completar para 1000 mL água destilada, pH 6.5; 15g de ágar |
| MIC3 | NFb Tween 80 | 5 g Tween 80; 5 mL K ₂ HPO ₄ sol. 10%; 2 mL MgSO ₄ 7 H ₂ O sol. 10% ;1 mL NaCl sol. 10%; 2 mL CaCl ₂ 2 H ₂ O sol. 1%; 2 mL de solução de micronutrientes para NFb; 2 mL de bromotimol sol. 0.5% em 0.2 N de KOH; 4 mL de FeDTA sol. 1.64% ou 0.4g de FeSO ₄ 7 H ₂ O; 4,5 g KOH; 15g de ágar, pH 6.5 |
| MIC4 | NFb Málico | 5 g ácido málico; 5 mL K ₂ HPO ₄ sol. 10%; 2 mL MgSO ₄ 7 H ₂ O sol. 10%; 1 mL NaCl sol. 10%; 2 mL CaCl ₂ 2 H ₂ O sol. 1%; 2 mL de solução de micronutrientes para NFb; 2 mL de bromotimol sol. 0.5% em 0.2 N de KOH; 4 mL de FeDTA sol. 1.64% ou 0.4g de FeSO ₄ 7 H ₂ O; 4,5 g KOH; 15g de Agar, pH 6.5 |
| MIC5 | Frutose nutritivo | 200 g batata; 20g frutose; 15g de ágar; pH 6,8-7,0 |
| MIC6 | MS com antibiótico | 15 g caldo de soja triplicaseína; 3 g peptona bacteriológica; 10 g extrato de malte; 2 g extrato de levedura; 1 mL de solução de micronutrientes; 2 mL de MgSO ₄ 7 H ₂ O sol. 10%; 1 mL de FeDTA sol. 1.64% ou 0.4g de FeSO ₄ 7 H ₂ O; 1 g asparagina; 15g de ágar; pH 6,8-7,0 |
| MIC7 | Manose nutritivo | 200 g batata; 20 g manose; 20 g sacarose; 4 mL vitamina; 8 mL solução de micronutrientes; 15 g de ágar; pH 6,8-7,0 |
| MIC8 | Ácido málico | 200 g batata; 20 g ácido málico; 4 mL vitamina; 8 mL solução de micronutrientes; 15 g de ágar; pH 6,8-7,0 |

| | | |
|-------|-------------------------------------|---|
| MIC9 | BDA com antibiótico | 200 g batata; 20g dextrose; 15g de ágar; pH 6,8-7,0 |
| MIC10 | Sacarose nutritivo | 200 g batata; 20 g sacarose; 4 mL vitamina; 8 mL solução de micronutrientes; 15 g de ágar; pH 6,8-7,0 |
| | Meio T2 (Pazoutová et al., 2000) | 100 g sacarse; 10 g L-asparagina; 0,1 g extrato de lavedura; 0,25 g K ₂ HPO ₄ ; 0,25 g MgSO ₄ 7 H ₂ O; 0,02 g FeSO ₄ 7 H ₂ O; 0,015 g ZnSO ₄ 7 H ₂ O; 0,12 g KCl; 1 g Ca NO ₃) ₂ 4 H ₂ O ; 20g de agar; 1000 mL água destilada, pH 5,2. |

* Chinnadurai et al., 1970

Solução de Micronutrientes para NFb

0.2 g de Na₂MoO₄ . 2 H₂O

0.235 g de MnSO₄ H₂O

0.28 g de H₃BO₃

0.008 g CuSO₄ . 5 H₂O

0.024 g de ZnSO₄ . 7 H₂O

Completar para 200 mL com água destilada.

Solução de vitaminas

10 mg biotina

20 mg peridoxol

100 mL água destilada esterilizada

Solução de antibióticos

0,1 g Gentamicina

0,05 g Tetraciclina

10 mL água destilada esterilizada