



## Primeiro registro de *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs como endofítico em raízes de sorgo no Brasil<sup>(1)</sup>.

**Rejane Maria Ferreira da Silva**<sup>(2)</sup>; **Maielly Inês Sena da Silva**<sup>(3)</sup>; **Rafael José Vilela de Oliveira**<sup>(4)</sup>; **Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti**<sup>(5)</sup>; **Gladstone Alves da Silva**<sup>(6)</sup>; **José Luiz Bezerra**<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq.

<sup>(2)</sup> Mestranda do programa de pós-graduação em Biologia de Fungos; Universidade Federal de Pernambuco; Recife, Pernambuco; re.biologicas@gmail.com; <sup>(3)</sup> Estudante do curso Ciências Biológicas; Universidade Federal de Pernambuco; <sup>(4)</sup> Doutorando do programa pós-graduação em Biologia de Fungos; Universidade Federal de Pernambuco; <sup>(5)</sup> Professora; Universidade Federal de Pernambuco; <sup>(6)</sup> Professor; Universidade Federal de Pernambuco;

<sup>(7)</sup> Professor; Universidade Federal do Recôncavo Baiano.

**RESUMO:** O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma gramínea que destaca-se por adaptar-se bem em regiões onde há deficiência hídrica. Os fungos endofíticos são caracterizados por habitarem partes aéreas e subterrâneas de plantas sem causar sintomas visíveis. Esse trabalho tem como objetivo registrar a primeira ocorrência de *Exserohilum rostratum* como endofítico em raízes de sorgo no Brasil. As coletas de raízes foram realizadas na Unidade de Execução de Pesquisa de Itapirema pertencentes ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) no Município de Goiana, PE, em julho de 2014. Após a coleta as raízes foram lavadas com água corrente e detergente neutro, fragmentadas em 1 cm de comprimento e desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 3 minutos. Em seguida o material foi lavado 2 vezes em água destilada esterilizada. Seis fragmentos de raízes foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, contendo ágar malte acrescido de cloranfenicol (50mg/L-1). Após o crescimento fúngico, fragmentos de micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA para identificação com base nas características macro e microestruturais, com auxílio de literatura especializada e posterior confirmação utilizando o método de biologia molecular.

**Termos de indexação:** rDNA; Filogenia; Taxonomia

### INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), constitui uma das principais fontes de valor nutritivo, apresentando bom rendimento e sendo de fácil processo operacional durante a colheita e armazenagem (Neumann et al. 2004). Essa gramínea destaca-se por adaptar-se bem em diversos ambientes, por possuir ciclo rápido, alta produtividade de biomassa verde, alto rendimento de etanol, além de ter seu bagaço utilizável como

fonte de energia (Durães, 2011). Os fungos endofíticos são transmitidos verticalmente pelas sementes ou penetrando através da zona radicular através de ferimentos causados pela abrasão das raízes com o solo durante o crescimento, e horizontalmente utilizando aberturas naturais, tais como estômatos. A maioria dos microorganismos endofíticos presente na rizosfera também podem ser encontrados nas raízes, sendo este órgão considerado uma importante fonte de endófitos (Germida et al. 1998; Sessitsch et al. 2002). *Exserohilum rostratum* tem causado doenças em várias plantas (Yamaguchi & Mutsunobu, 2010; Poltronieri et al. 2008), além disso é reportado causando doenças em humanos e animais domésticos tais como: gatos, cães, cavalos e bovinos (Padhye et al., 1986). *Setosphaeria rostrata* foi descrita por Leonard (1976) induzindo a fase sexuada *Exserohilum rostratum*. Apesar de *E. rostratum* ter sido descrita em *Vitis vinifera* *S. rostrata* foi descrita a partir de uma combinação de isolados provenientes de *Hordeum vulgare* e sementes de *Sorghum halepense*. Esse trabalho teve como objetivo registrar a primeira ocorrência de *Exserohilum rostratum* como endofítico em raízes de sorgo no Brasil.

### MATERIAS E METODOS

A coleta de raízes foi realizada na Unidade de Execução de Pesquisa de Itapirema pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) no Município de Goiana, PE. Após a coleta as raízes foram lavadas com água corrente e detergente neutro, fragmentadas em 1 cm de comprimento e desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 3 minutos. Em seguida o material foi lavado 2 vezes em água destilada esterilizada. Seis fragmentos de raízes foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, contendo ágar malte acrescido de cloranfenicol (50mg/L-1). Após o crescimento fúngico, fragmentos de micélio foram transferidos

para tubos de ensaio contendo meio BDA para identificação, com base nas características macro e microestruturais, com auxílio de literatura especializada (Ellis, 1971; Ellis, 1976; Leonard, 1976).

#### Extração, amplificação (PCR) e sequenciamento de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al. (2005), para amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes seguiram Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008).

#### Análise filogenética

As sequências obtidas foram alinhadas com outras recuperadas do GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Larkin et al. 2007). As árvores filogenéticas foram geradas a partir da análises bayesiana e de máxima verossimilhança, utilizando os programas MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e PhyML (Guindon & Gascuel, 2003), executados a partir do programa Topali 2.5 (Milne et al., 2004).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as espécies isoladas foi encontrada uma interessante espécie identificada como *Exserohilum rostratum*. O táxon apresenta conídios elípticos ou estritamente rostrados, cor marrom a oliváceo com 1-15 septos, solitários, com uma média de 166,8 µm de comprimento e 11,1 µm de diâmetro, variando de (50-250) × (10-12,5) µm. (Figura 1).



Figura 1: Conídios de *Exserohilum rostratum* isolados de *Sorghum bicolor*.

Leonard (1976) ao descrever *Exserohilum rostratum* relatou conídios apresentando (15-190) × (7-29) µm. Foram realizadas análises filogenéticas a partir do seqüenciamento da região ITS do rDNA. As sequências apresentam identidade de 99% e 100% com sequências depositadas no NCBI como *Exserohilum rostratum* e *Setosphaeria rostrata*, sendo essas sequências utilizadas nas análises filogenéticas onde estão agrupadas com nossas sequências (Figura 2). *Exserohilum rostratum* é comumente reportada como fitopatógeno principalmente em gramíneas tendo ultimamente novos registros em abacaxi (Luo et al., 2012) e cana de açúcar (Ahmadpour et al., 2013). Kumaresan & Suryanarayanan (2001) observaram a presença de *E. rostratum* como endofítico em folhas *Lumnitzera racemosa* (floresta de manguezal do estuário no sul da Índia). O fato de uma espécie conhecida como fitopatógeno ocorrer como endofítico em raiz é de grande importância para ciência. Este é o primeiro registro de *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs, como endofítico em raízes de sorgo no Brasil.

### CONCLUSÕES

Novos estudos são necessários para a estimativa da comunidade de fungos endofíticos associados as raízes, e possivelmente novas e raras espécies poderão ser encontradas.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsas e financiamento do trabalho.

### REFERÊNCIAS

- AHMADPOUR, A.; KARAMI, S.; HEIDARIAN, Z. et al. *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. *Plant Disease Notes*, 1: 97-99, 2013.
- DURÃES, F. O. M. Sorgo sacarino: tecnologia agrônoma e industrial para alimentos e energia. *Revista Agroenergia*. Embrapa milho sorgo, 2011.
- ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England 608, 1971.
- ELLIS, M. B. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew. England 507, 1976.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, J. R. et al. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26: 43-50, 1998.



GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R. T. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas* 18:19-32, 2005.

GUINDON, S. & GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704, 2003.

KALIYAPERUMAL, M. & KALAICHELVAN, P. T. *Ganoderma australe* from southern India. *Microbiological Research* 163: 286-292, 2008.

KUMARESAN, V. & SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycol. Res.* 11:1388-1391, 2001.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948, 2007

LEONARD K. J. Synonymy of *Exserohilum halodes* with *E. rostratum*, and induction of the ascigerous state, *Setosphaeria rostrata*. *Agricultura Research Service, U. S. D. A.* 1976.

LUO, Z. W.; HE, F.; FAN, H. Y.; et al. First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Exserohilum rostratum* on Pineapple in Hainan Province, China. *Plant Disease* 3:458-458, 2012.

MILNE, I., WRIGHT, F., ROWE, G. et al.: TOPALi: Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20: 1806-1807, 2004.

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*Zea mays*, L.) na produção do novilho super precoce. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 3:438-452, 2004.

POLTRONIERI, L. S.; VERZIGNASSI, J. R.; COSTA, R. C. O. Primeiro registro de *Exserohilum rostratum* (anamorfo de *Setosphaeria rostrata*) causando manchas foliares em açaizeiro no Brasil. *Summa Phytopathol., Botucatu*, 2:137-138, 2008.

PADHYE A. A.; AJELLO L.; WIEDEN M. A. et al. Phaeohyphomycosis of the nasal sinuses caused by a new species of *Exserohilum*. *J Clin Microbiol* 24:245-249. 1986.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P.. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574, 2003.

SCHULZ, B. & BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 6:661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106:996-1004, 2002.

SESSITSCH, A.; REITER, B., PFEIFER, U. et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:23-32, 2002.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Eds). Academic Press, 315-322, 1990.

YAMAGUCHI, K. & MUTSUNOBU, M. A simple selective medium for the primary isolation of *Bipolaris*, *Drechslera* and *Exserohilum* species. *Bull. Minamikyushu Univ.* 40: 55-58, 2010.

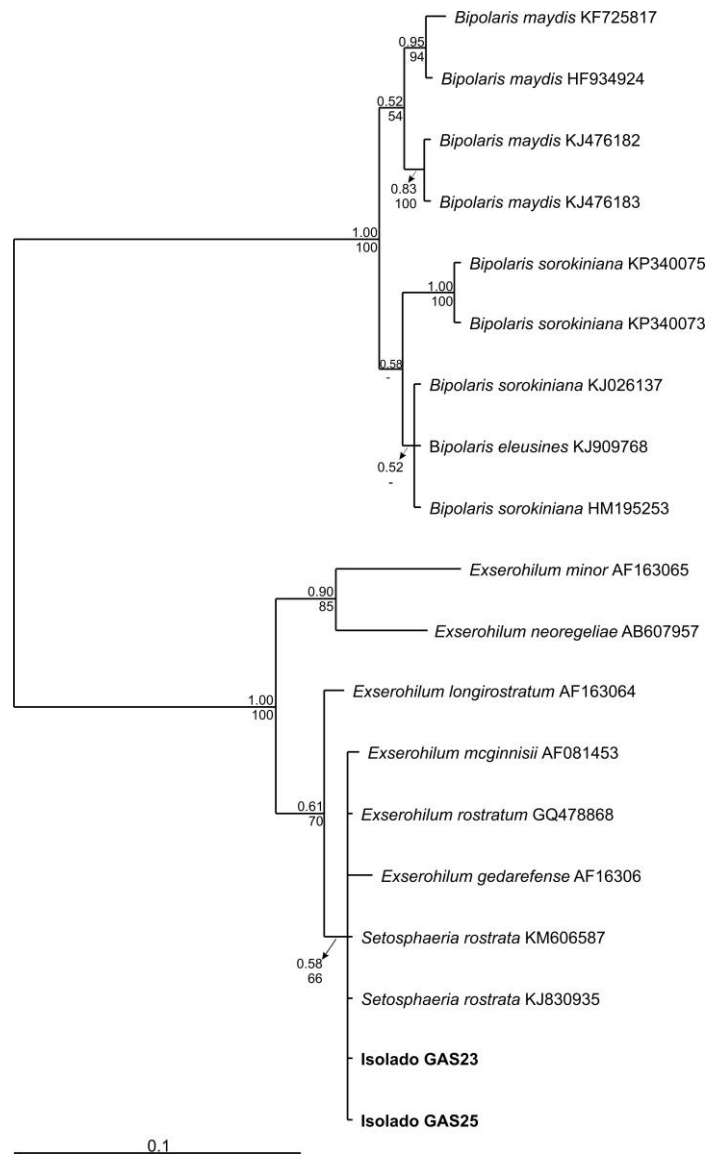


Figura 2. Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento da espécie *Setosphaeria rostrata*, isolada como endófito em raízes de *Sorghum bicolor* L. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.