

Indução de Alterações Genéticas em Isolados de *Colletotrichum Graminicola* Auxiliares no Esclarecimento do(s) Processo(s) que Gera(m) Alta Variabilidade Patogênica.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

¹Léia C.L.F., ²Edneia A.S.P., ¹Cleide A.B., ³Carlos R.C ^{1*}Luzia D.P.M.

¹Dept de Biologia Geral, CCB/ UEL, ² Depto de Agronomia, CCA/UDEL, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990 Londrina/PR. ³ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, Caixa Postal 151, CEP 35701-970. * autor para correspondência paccola@uel.br

Palavras-chave: Mutantes; variabilidade genética; resistência; auxotrofia

A antracnose do sorgo é causada pelo Deuteromiceto *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson (Syn. *Colletotrichum sublineolum* P. Henn) o qual apresenta alta variabilidade e especialização patogênica. A elevada variabilidade e especialização patogênica de *C. graminicola* dificulta o desenvolvimento de programas eficientes de melhoramento genético neste cereal, devido à possibilidade do patógeno quebrar as formas de resistência de cultivares (Casela e Ferreira, 1994). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a elevada variabilidade patogênica em *C. graminicola*. Estes incluem a heterocariose, aneuploidia, recombinação, mutação e, recentemente, o possível envolvimento de elementos genéticos de transposição (Casela e Frederiksen, 1994). A utilização de linhagens de *C. graminicola* marcadas geneticamente constitui um método que possibilitaria um estudo mais detalhado do ciclo parassexual do agente causal da antracnose, bem como a observação de outros possíveis mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento da variabilidade patogênica de *C. graminicola*. Este trabalho teve por objetivo introduzir marcas genéticas em linhagens de *C. graminicola* que auxiliem na compreensão dos processos de transferência de material genético entre as linhagens através do parassexual do fungo.

Materiais e Métodos

Linhagens: Sete linhagens monospóricas isoladas de sorgo, obtidas do banco de linhagens do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo - Embrapa Sete Lagoas/MG foram mantidas em meio sólido de farinha de aveia sob refrigeração.

Caracterização das linhagens selvagens: As linhagens selvagens foram cultivadas em meio completo sólido (Pontecorvo *et al.*, 1953). Micélio de cada linhagem foi inoculado em placas contendo: A) meio mínimo; B) meio mínimo acrescido de solução de vitaminas, aminoácidos e ácidos nucleicos (MM+T); C) MM+T – aminoácidos; D) MM+T – ácido nucleico; E) MM+T - solução de vitaminas. As placas foram incubadas à 25°C durante três dias. As colônias que não cresceram nesses meios, foram caracterizadas separadamente para a determinação da deficiência específica.

Curva de sobrevivência ao agente mutagênico ultravioleta: Conídios de *C. graminicola* foram irradiados com o mutagênico UV durante 0, 1,5, 3, 4,5 e 6 minutos. Para cada tempo de exposição foram feitas diluições apropriadas dos conídios e plaqueadas em meio completo. Após três dias de crescimento na ausência de luz, observou-se o número de colônias crescidas com a finalidade de se determinar o tempo de exposição ao UV necessário para obter 1 a 5% de conídios sobreviventes.

Curvas de crescimento em presença do fungicida Benlate (Benomyl) e ciclohexamida: Conídios foram inoculados em presença de doses crescentes do fungicida Benlate (Benomyl) e Ciclohexamida. Após cinco dias verificou-se a dose necessária para impedir 100% do crescimento fúngico.

Obtenção e seleção de mutantes: Mutantes foram obtidos com o mutagênico UV.

- *Mutantes auxotróficos:* Para obtenção de mutantes auxotróficos foram utilizados os métodos de enriquecimento por filtração e o de isolamento total.

- *Mutantes morfológicos:* Os mutantes morfológicos foram selecionados através de observação visual da morfologia alterada das colônias.

- *Mutantes resistentes a agentes inibidores:* Conídios irradiados foram inoculados em meio BDA acrescido dos agentes inibidores. Foram considerados mutantes resistentes aqueles que germinaram e formaram colônias com diâmetro 50% maior que os selvagens.

- *Mutantes com duplas marcas genéticas:* Mutantes contendo uma única marca genética foram submetidos ao tratamento com luz UV e caracterizados quanto a presença de um segundo marcador genético.

Resultados e discussões

Caracterização das linhagens selvagens: As sete linhagens não cresceram em meio mínimo, indicando uma deficiência natural para vitaminas, especificamente biotina. Desse modo, foi necessária a adição deste nutriente aos meios de cultivo das linhagens.

Curvas de sobrevivência ao agente mutagênico ultravioleta: Foi possível evidenciar uma correlação entre a dose e o efeito produzido quando as linhagens foram tratadas com luz ultravioleta, sugerindo que este mutagênico é eficiente para causar letalidade em conídios de *C. graminicola*. O tempo de exposição necessário para obter 1 a 5% de conídios sobreviventes foi 3 minutos para as linhagens 15B, 15E e 30399 e de 2 minutos para as linhagens 30C e R-59, revelando maior sensibilidade destas últimas à luz UV (Figura 1).

Curvas de crescimento à agentes inibidores: A concentração de Benlate necessária para impedir o crescimento das linhagens 15B e 30399 foi 40 µg/mL de meio BDA. O crescimento radial das colônias evidenciou maior sensibilidade da linhagem 30399 na dosagem 40 µg/mL (Figura 2).

A concentração de Ciclohexamida necessária para impedir o crescimento das linhagens 30C, 15B e 15E foi de 2 µg/mL de meio BDA. A linhagem 15E apresentou crescimento micelial menor em relação às linhagens 30C e 15B, evidenciando a sensibilidade da linhagem 15E a agente inibidor de síntese protéica (Figura 3).

Obtenção de mutantes: Muitos mutantes foram obtidos, o que possibilita a condução de estudos genéticos a fim de verificar a forma de transferência de material genético nesta espécie. Aproximadamente 700 colônias das linhagens 15B e 145.97 foram analisadas para seleção dos respectivos mutantes. Para obtenção de mutantes resistentes à ciclohexamida, foram analisadas 220 colônias da linhagem 15E e 100 colônias da linhagem 30C. As linhagens resistentes ao Benomyl foram obtidas a partir da análise de aproximadamente 300 colônias do isolado 243.97, sendo selecionadas principalmente a partir de setores liberados em colônias cultivadas em presença do fungicida (Tabela 1).

O melhor método para obtenção de mutantes auxotróficos foi o de isolamento total. Segundo Panaccione *et al.* (1989) e Souza-Paccola *et al.* (in press), *C. graminicola* produz dois tipos de conídios, o falcado em cultura sólida e o oval em cultura líquida. A produção de conídios ovais em meio líquido a partir de hifas prototróficas diminuiu a probabilidade de obtenção de mutantes auxotróficos pela técnica de enriquecimento por filtração, uma vez que, devido ao seu pequeno diâmetro, os conídios ovais não ficam retidos nas malhas do filtro, aumentando

a frequência de prototróficos no filtrado. Recomendamos portanto, o método de isolamento total para seleção de mutantes auxotróficos nesta espécie.

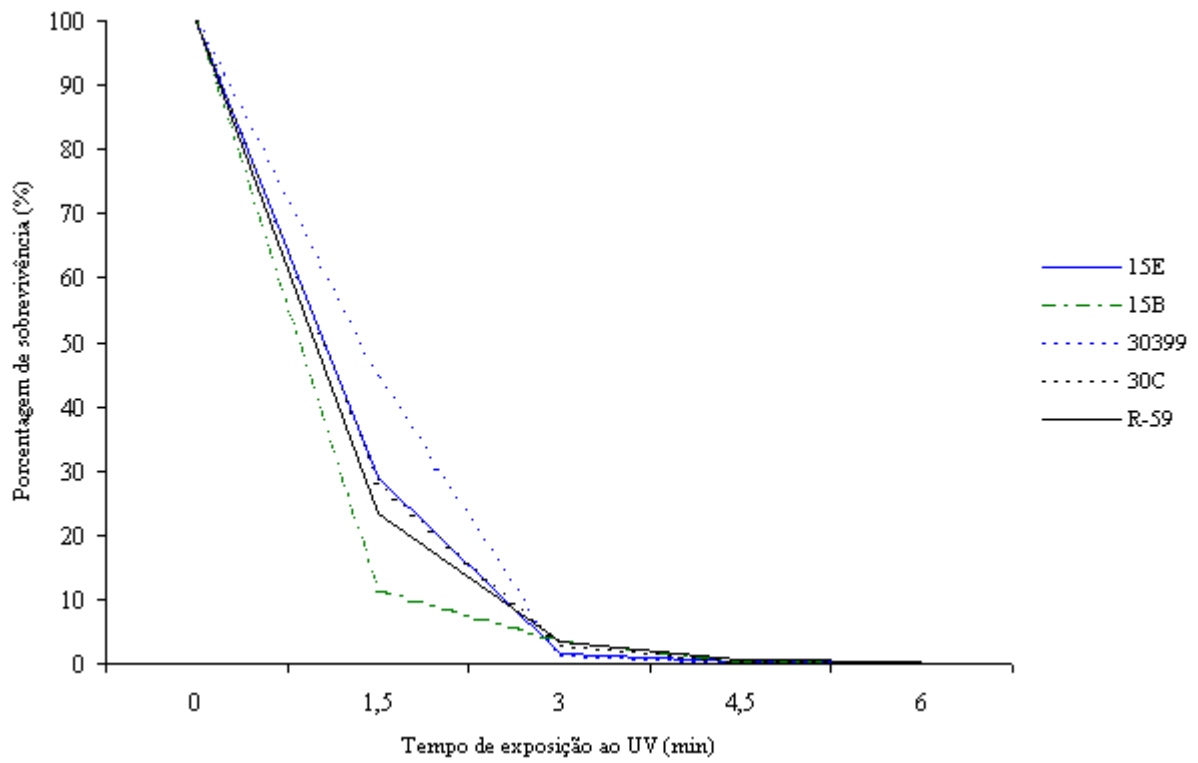


Figura 1. Curvas de sobrevivência das linhagens selvagens de *C. graminicola* ao agente mutagênico ultravioleta

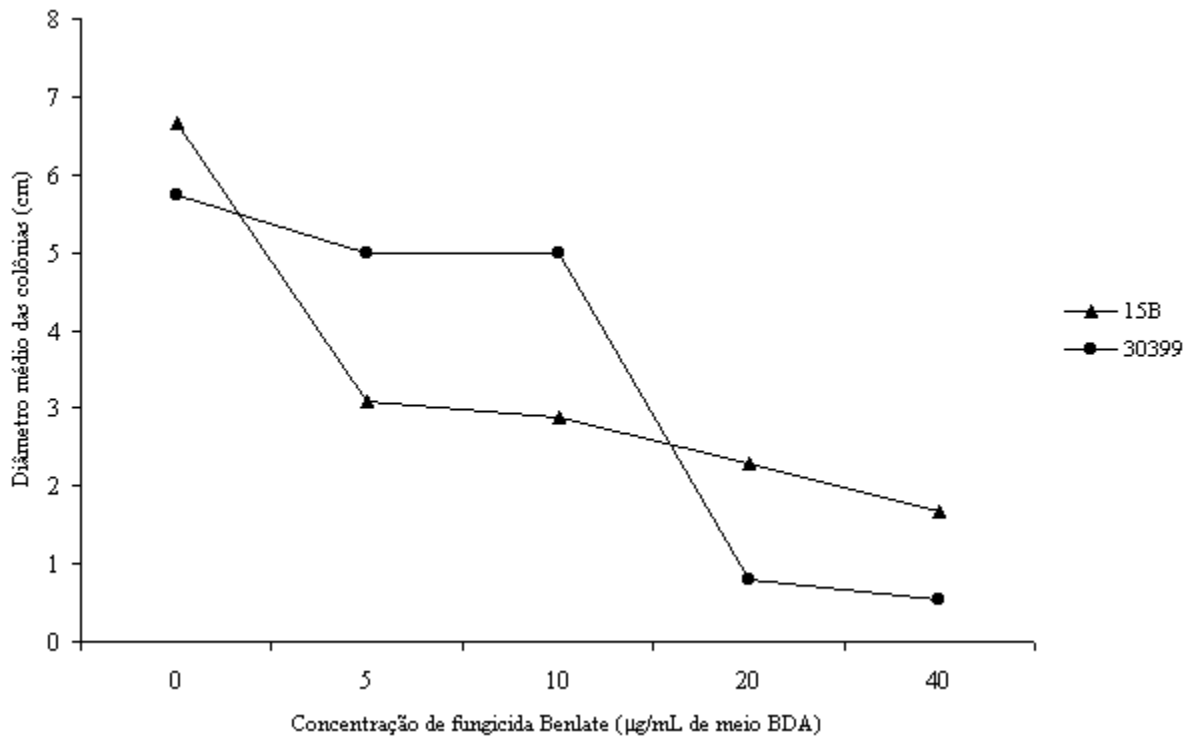


Figura 2. Curvas de crescimento de duas linhagens selvagens de *C. graminicola* ao fungicida Benlate

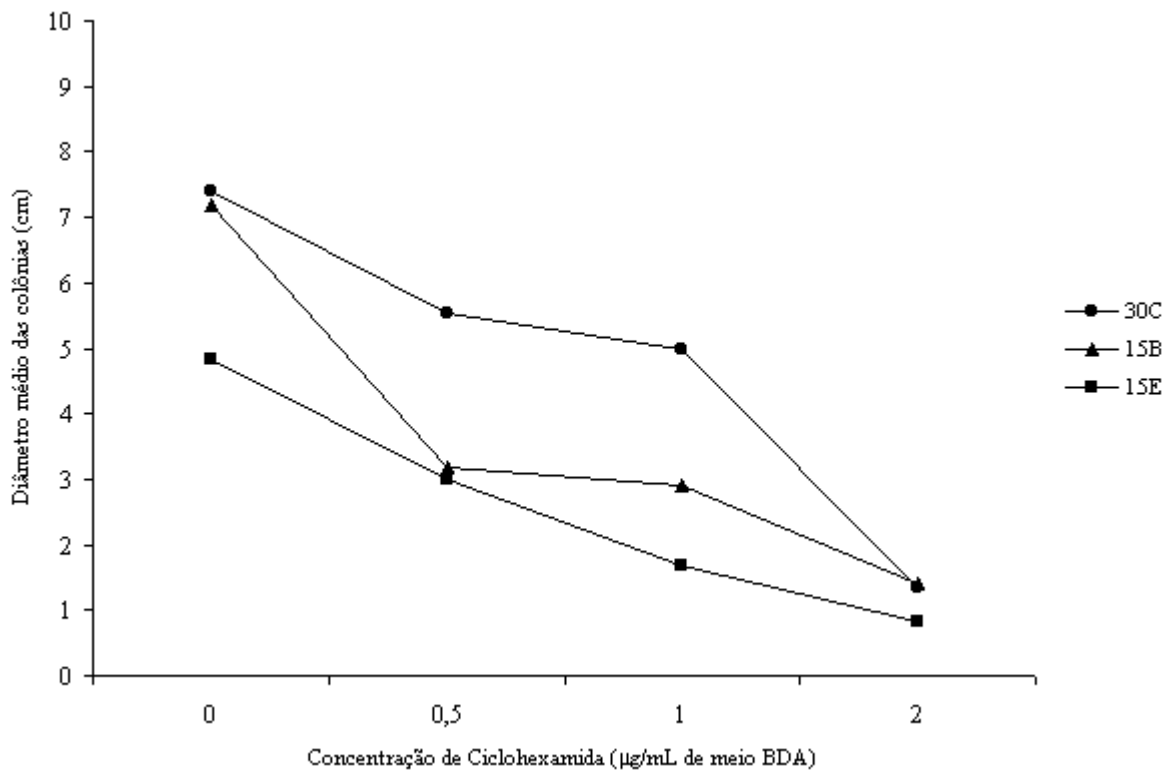


Figura 3. Curvas de crescimento de linhagens selvagens de *C. graminicola* em presença de Ciclohexamida

TABELA 1 – Mutantes de *C. graminicola* obtidos por exposição ao Mutagênico UV e seus respectivos fenótipos

Selvagem	Mutantes	Fenótipo(*)
243.97 Bio ⁻	243.1/1	Ben ^R , branco
	243.1/2	Ben ^R , alaranjado forte
	243.1/3	Ben ^R , cinza
30C Bio ⁻	30C/Cyc	Cyc ^R
	30C/Cyc/8	Cyc ^R , branco
15E Bio ⁻	15E/Cyc	Cyc ^R
	15E/Cyc/E	Cyc ^R , cinza
	15E/cy-E	Cyc ^R , escuro
15B Bio ⁻	15B/42	Nic ⁻ , rosa claro
	15B/45	Paba ⁻ , rosa claro
	15B-46	Piro ⁻ , rosa claro
	15B-51	Tia ⁻ , rosa claro
145.97 Bio ⁻	145.2	Tia ⁻

(*)

Os símbolos Bio⁻, Paba⁻, Piro⁻, Tia⁻, Nic⁻ e Vit⁻ representam deficiência para biotina, ácido p-aminobenzóico, piridoxina, tiamina, ácido nicotínico e vitamina, respectivamente. Os símbolos Ben^R e Cyc^R representam resistência ao fungicida Benlate e à Ciclohexamida.

Literatura Citada

- CASELA, C.R., FERREIRA, A.S. *Resistência vertical a Colletotrichum graminicola, agente causal da antracnose do sorgo*. Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1992-1993, v.6, p.183-184, 1994.
- CASELA, C.R., FREDERIKSEN, R.A. *Pathogenic variation in monoconidial culture from a single lesion and monoconidial subcultures of the sorghum anthracnose fungus Colletotrichum graminicola*. Fitopatologia Brasileira, v.19, p.149-153, 1994.
- PANACCIONE, D. G., VAILLANCOURT, L. J. & HANAU, R.M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. Mycologia. 81:875-882. 1989.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J. *The genetics of Aspergillus nidulans*. Adv. Genet., 5: 141-238, 1953.

