



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GABRIELA FERREIRA ZANETTE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E TENTATIVA DE  
OBTENÇÃO DE FASE SEXUADA EM *Colletotrichum  
sublineolum***

---

Londrina  
2007

**GABRIELA FERREIRA ZANETTE**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E TENTATIVA DE  
OBTENÇÃO DE FASE SEXUADA EM *Colletotrichum*  
*sublineolum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola- Meirelles

Londrina  
2007

**GABRIELA FERREIRA ZANETTE**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E TENTATIVA DE  
OBTENÇÃO DE FASE SEXUADA EM *Colletotrichum  
sublineolum***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles  
Departamento de Biologia Geral  
CCB-UEL

---

Prof. Dr. Eduardo Bagagli  
UNESP/Botucatu – SP

---

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto  
Departamento de Microbiologia  
CCB-UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2007.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela força e oportunidade de estar completando mais esta etapa do meu desenvolvimento.

Ao **Departamento de Biologia Geral** e a **Coordenação do Mestrado em Genética e Biologia Molecular** por possibilitarem a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Luzia Doretto Paccola-Meirelles**, pela valiosa orientação, apoio, paciência, amizade, e incentivo em todas as etapas deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Gisele Maria Andrade de Nóbrega**, pelas sugestões, conselhos e amizade.

Aos professores do Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação. Em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Claudete Ruas** por ter cedido seu laboratório para a realização das análises moleculares.

À minha família, **Agenor, Neide e Jeruza**, pelo incentivo, amparo e amor. Obrigada por vocês estarem presentes em minha vida.

Ao meu melhor amigo e namorado **Ivan Vieira**, por todo o carinho, paciência, discussões e divagações, apoio e presença constante.

Aos amigos e companheiros do **Laboratório de Genética de Microrganismos**, **Ideval de Souza, Ednéia Souza-Paccola, Cleide Bomfeti, Kátia Rocha, Júnior Menolli, Maria Eugênia Scanferla, Eliseu Pedro**, pela amizade adquirida, incentivo e bons momentos.

Aos amigos do mestrado, **Lara Ferracin, Karen Suzuki, Juliano Villas Boas, Vanessa Kostetzer, Vivian Moraes, Vitor Delai, Thiago Fernandes, Fernando Postalli** e **Sandra Sahyun**, por todas as risadas, desabafos, conversas motivadoras e companheirismo.

Aos meus tios **Flávio Zanette, Lucia Zanette**, minha prima **Carolina Zanette** a amiga **Ivete Kuakoski** por todo o carinho e por terem confiado em mim nos primeiros passos deste trabalho.

Às minhas amigas queridas de Cuiabá **Cris Aguiar, Liz Busatto** e **Tathi Vinhal**, e ao amigo **Felipe Lobo**, que sempre me incentivaram e me deram todo o carinho e amizade de que precisei nos momentos estressantes.

A **Sueli Trindade**, por toda a disponibilidade, sorrisos e atenção.

Ao *Colletotrichum sublineolum*, por ser tão "complexo" e instigante.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Tem gente que não enlouquece nunca. Que  
vida chata eles devem ter..."

C. Bucowski

ZANETTE, Gabriela Ferreira. **Caracterização fenotípica e tentativa de obtenção de fase sexuada em *Colletotrichum sublineolum***. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

A antracnose do sorgo (*Sorghum bicolor* L.), causada pelo patógeno *Colletotrichum sublineolum* P. Henn, é uma das mais importantes doenças que afetam a cultura no Brasil, estando presente em todas as regiões de plantio. O presente trabalho teve como objetivos: (I) caracterizar linhagens selvagens e mutantes para o gene da nitrato redutase em relação à morfologia, conidiação, produção de esclerócios e presença de genes para mating –type e; (II) estabelecer condições eficientes para a obtenção e regeneração de protoplastos de *C. sublineolum*. Uma alta variabilidade pode ser observada na produção de conídios ovais e falcados, assim como no tamanho dos conídios ovais e no crescimento radial das colônias. Algumas linhagens liberaram setores, confirmando a alta instabilidade deste patógeno. Foram observadas as características de produção, germinação e desenvolvimento de esclerócios produzidos pelas linhagens *in vitro*, tanto por linhagens selvagens como mutantes e testes de germinação e desenvolvimento demonstraram diferenças entre os fatores limitantes (temperatura, aeração e luz), sendo este o primeiro relato na literatura. A caracterização das linhagens quanto a presença de genes MAT foi realizada por meio de PCRs. Os genes de mating type foram amplificados demonstrando que ambos os idiomorfos estão presentes nesta espécie. Algumas linhagens não amplificaram para nenhum dos idiomorfos, indicando que talvez essas linhagens não possuam o gene MAT ou este não codifica uma proteína com uma região *alpha box* ou *HMG box*. Foram testadas duas enzimas líticas comerciais, para a obtenção dos protoplastos a partir de micélio e conídios ovais. Maior produção de protoplastos foi obtida com o uso da enzima Glucanex. Com a enzima Lysing enzyme (Sigma) não foi possível o isolamento de protoplastos a partir de conídios, apenas de micélio. Entretanto, uma maior frequência de regeneração foi observada para protoplastos obtidos a partir de micélio com a enzima Lysing enzyme(Sigma). Este é o primeiro relato de produção e regeneração de protoplastos na espécie. Todas as linhagens estudadas foram auto-estéreis. Não foi possível correlacionar o fenótipo mutante para auxotrofia, com as características morfológicas avaliadas.

**Palavras-chave:** Dimorfismo conidial. Esclerócios. mating-type. Protoplastos.

ZANETTE, Gabriela Ferreira **Phenotype characterization and attempt of obtainment of sexual phase in *Colletotrichum sublineolum***. 2007. 102f. Dissertation (Masters in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## ABSTRACT

Antracnose of sorghum (*Sorghum bicolor* L.), caused by pathogen *Colletotrichum sublineolum* P. Henn, is one of the most important diseases that affect the crops in Brazil, being present in all of the cultured regions. The present work had as objective: (I) to characterize morphogenetically wild and mutant strains for the gene of nitrate reductase in relation to the morphology, conidiation, production of esclerotia and presence of genes for mating - type and; (II) to establish efficient conditions for the isolation and regeneration of protoplasts of *C. sublineolum*. One high variability can be observed in the production of oval and falcate conidia, as well as in the size of the oval conidia and in the radial growth of the colonies. Some strains had liberated sectors, confirming the high instability of this pathogen. The characteristics of production, germination and development had been observed of esclerotia produced for the strains *in vitro*, as much for wild as mutant strains and tests of germination and development had demonstrated differences between the factors limitants(temperature, aeration and light), being this the first report in the literature. The characterization of the strains for the presence of MAT genes was carried out by PCRs. The genes of mating type had been amplified demonstrating that both the idiomorphs are present in this species. Some strains had not being amplified for none of the idiomorphs, indicating that perhaps these strains do not possess MAT genes or these does not codify a protein with a region alpha box or HMG box. Two commercial litic enzymes had been tested to obtain protoplasts from mycelia and oval conidia. A higher production of protoplasts was obtained with the use of enzyme Glucanex. With the Lyzing enzyme (Sigma) the isolation of protoplasts from oval conidia was not possible, only from mycelia. However, a higher frequency of regeneration was observed for protoplasts obtained from mycelia utilizing the Lysing enzyme (Sigma). This is the first report of production and regeneration of protoplasts in this species. All the studied strains had been incapable of auto-crossing. It was not possible to correlate the mutant for auxotrophic phenotype, with the evaluated morphologic characteristics. This work intends to give continuity to the studies of genetics events that produces variability in *C. sublineolum*.

**Keywords:** Conidial dimorphism. Sclerotia. Mating-type. Protoplasts

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1** – A bioquímica da conversão de nitrato a íons amônio .....20

### ARTIGO I

**Figura 1** – Conídios ovais obtidos de linhagens mutantes de *C. sublineolum*.....65

**Figura 2** – Esclerócios obtidos a partir da linhagem 15B.04 de *C. sublineolum*.....66

**Figura 3** – Germinação (setas) de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* .....67

**Figura 4** – Germinação e crescimento de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* em meio BDA, por 7 dias à 25°C .....72

**Figura 5** – Germinação e crescimento de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* em meio BDA, por 7 dias à 37°C .....72

**Figura 6** – Esquema da estrutura do gene MAT e da amplificação da região conservada do gene .....77

**Figura 7** – Produtos de PCR obtidos com o par de primers NcHMG (MAT2) em gel de agarose 1,4% .....77

**Figura 8** – Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do primer HMGgram (MAT2) em gel de agarose 1,4%.....79

**Figura 9** – Produtos da amplificação a partir do par de primers SkCM (MAT1) em gel de agarose 1,4%.....79

### ARTIGO II

**Figura 1** – Protoplastos da linhagem 15B.15 de *C. sublineolum* obtidos a partir de conídios ovais (Aumento de 50X) .....98

**Figura 2** – Protoplastos da linhagem 15B.15 de *C. sublineolum* obtidos a partir de conídios ovais (Aumento de 125X) .....98

## LISTA DE TABELAS

### MATERIAL E MÉTODOS

**Tabela 1** – Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho .....25

### ARTIGO I

**Tabela 1** – Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho .....58

**Tabela 2** – Características culturais de *C. sublineolum*: crescimento vegetativo e produção de conídios falcados e ovais .....63

**Tabela 3** – Caracterização morfológica de linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* quanto á produção de esclerócios e estruturas reprodutivas assexuais em meio àgar-água acrescido de folhas de sorgo.....70

### ARTIGO II

**Tabela 1** – Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho .....95

**Tabela 2** – Produção de protoplastos em linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* após tratamento enzimático de pontas de hifa e conídios ovais .....96

**Tabela 3** – Regeneração de protoplastos de linhagens mutantes e selvagens de *C. sublineolum* após tratamento enzimático de pontas de hifa e conídios ovais .....97

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 SORGO ( <i>SORGHUM BICOLOR</i> ) .....	13
1.2 CARACTERÍSTICAS DO PATÓGENO CAUSADOR DA ANTRACNOSE E SINTOMAS DA DOENÇA .....	14
1.3 TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL GENÉTICO EM <i>C. SUBLINEOLUM</i> .....	16
1.4 MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELA VARIABILIDADE PATOGÊNICA E INSTABILIDADE EM <i>C. SUBLINEOLUM</i> .....	19
1.5 PROTOPLASTOS.....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 LINHAGENS DE <i>COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM</i> .....	24
3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES .....	26
3.2.1 Caldo Batata Dextrosado (BD).....	26
3.2.2 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA).....	26
3.2.3 Meio Aveia-Ágar .....	26
3.2.4 Meio Mínimo (Pontecorvo <i>et al</i> , 1953).....	26
3.2.5 Meio Completo (Pontecorvo <i>et al</i> , 1953) .....	27
3.2.6 Meio Completo para a manutenção de mutantes <i>nit</i> .....	27
3.2.7 Meio Completo com estabilizador osmótico .....	27
3.2.8 Meio Ágar-Sabourand .....	28
3.2.9 Meio Cenoura-Agar (CA) (Tuite, 1969).....	28
3.2.10 Meio Suco de Tomate .....	29
3.2.11 Meio Àgar-Água acrescido de folhas de sorgo.....	29
3.2.12 Solução de Vitaminas.....	29
3.2.13 Solução de Biotina .....	30
3.2.14 Solução Salina 0,85% (p/v) .....	30
3.2.15 Solução de Tween 80 0,1% (v/v).....	30

3.2.16	Ácido Etilenodinitrilotetracético sal dissódico (EDTA) 0,5M pH 8,0	30
3.2.17	Tampão Tris-HCl pH 8,0 1M	31
3.2.18	Clorofane	31
3.2.19	Clorofil	31
3.2.20	Tampão de Extração	31
3.2.21	Tampão de Corrida TEB 10X	32
3.2.22	Tampão de Amostra	32
3.2.23	Tampão de Mcllvaine's pH 5,8	32
3.2.24	Solução de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,2M pH 5,8	33
3.2.25	Solução de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6M pH 5,8	33
3.2.26	Gel de Agarose (0,7% e 1,4%)	33
3.2.27	Solução de Brometo de Etídio	34
3.3	ESTERILIZAÇÃO	34
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	34
3.4.1	Produção de Conídios Falcados	34
3.4.2	Produção de Conídios Ovais	34
3.4.3	Avaliação do Crescimento Vegetativo	35
3.4.4	Produção, Germinação e Viabilidade de Esclerócios	35
3.5	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	36
3.5.1	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	37
3.6	TESTES DE COMPATIBILIDADE SEXUAL	38
3.7	OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS	39
3.7.2	Regeneração de Protoplastos	40
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>
	<b>ARTIGO I – CARACTERIZAÇÃO MORFOGENÉTICA DE LINHAGENS DE</b> <b>COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE</b> <b>DO SORGO</b>	<b>51</b>
	<b>RESUMO</b>	<b>53</b>
	<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>54</b>

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
2.1 LINHAGENS DE <i>COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM</i> .....	56
2.2 CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS FALCADOS E OVAIS.....	57
2.3 PRODUÇÃO, GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE ESCLERÓCIOS .....	59
2.4 TESTES DE COMPATIBILIDADE SEXUAL.....	60
2.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS .....	60
2.6 REAÇÕES EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	61
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
3.1 CARACTERÍSTICAS CULTURAIS: CRESCIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS FALCADOS E OVAIS .....	62
3.2 PRODUÇÃO, GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE ESCLERÓCIOS .....	65
3.3 TESTES DE COMPATIBILIDADE SEXUAL.....	73
3.4 IDENTIFICAÇÃO DE GENES PARA “ <i>MATING-TYPE</i> ” EM <i>C. SUBLINEOLUM</i> .....	74
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	80

## **ARTIGO II – ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS**

<b>DE <i>COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM</i></b> .....	88
<b>RESUMO</b> .....	90
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	91
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	91
2.1 LINHAGENS DE <i>COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM</i> .....	91
2.2 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS .....	93
2.3 REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS .....	94
<b>3 RESULTADOS</b> .....	95
3.1 ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS.....	95
3.2 REGENERAÇÃO DOS PROTOPLASTOS.....	96
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	100

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SORGO (*SORGHUM BICOLOR*)

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), pertencente à família *Gramineae/Poaceae*, é uma planta nativa da região da Etiópia e Sudão, de onde se propagou por todo o continente africano e asiático, atingindo posteriormente, a América e a Austrália (Frederiksen, 1986).

A cultura está posicionada entre as cinco mais importantes do mundo, sendo superada somente pelas culturas do trigo, milho, arroz e cevada. As suas principais utilizações são: alimentação animal e humana, formulação de rações e em forragens. Seu emprego na alimentação humana está restrita a algumas regiões da África e da Ásia (Waquil *et al.*, 2003).

A planta do sorgo adapta-se a uma gama de ambientes, principalmente, sob condições de deficiência hídrica, desfavoráveis à maioria de outros cereais. Essa característica permite que a cultura se desenvolva bem em regiões de cultivo com distribuição irregular de chuvas e em sucessão a culturas de verão (Santos, 2003). O sorgo tem mostrado grande potencial de produção, não somente por sua comprovada capacidade de suportar estresses ambientais, mas também, por ser mecanizável do plantio a colheita, por apresentar grande amplitude de épocas de plantio e viabilidade de utilização de equipamentos empregados em outras culturas como: soja, trigo e arroz (Coelho *et al.*, 2002).

No Brasil, são cultivados quatro tipos de sorgo: granífero, forrageiro, sacarino e vassoura. O sorgo granífero pode ser utilizado: na alimentação humana, principalmente na forma de farinha; na alimentação animal, por apresentar uma composição química bastante semelhante à do milho podendo substituí-lo como fonte energética em rações animais e na indústria, para a produção de amido, farinha, cerveja, cera, óleo comestível, etc. O sorgo forrageiro é utilizado principalmente para pastejo, fenação e cobertura morta. O sorgo sacarino é apropriado para a produção de açúcar e álcool. E o sorgo vassoura apresenta panículas com características especiais, que as tornam adequadas ao fabrico de vassouras e escovas (Ruas *et al.*, 1988).

Como qualquer outra cultura, esta também tem sido atacada por várias doenças, sendo a antracnose uma das mais importantes. A ocorrência generalizada da antracnose reduz, sensivelmente, a produção e a qualidade dos grãos e da forragem (Ferreira *et al.*, 1988). Atualmente a doença encontra-se presente em, praticamente, todas as regiões produtoras de sorgo no mundo, sendo predominante em regiões de clima quente e úmido envolvendo os trópicos semi-árido, úmido e regiões de clima temperado com temperaturas elevadas no período do verão (Ali & Warren, 1987; Pande *et al.*, 1991; Pande *et al.*, 1994) incluindo a África, Ásia e as Américas (Sutton, 1980). O fator comum entre as regiões de ocorrência da antracnose é a presença de chuvas freqüentes, principalmente durante o estágio de crescimento da cultura (Casela & Ferreira, 1998).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DO PATÓGENO CAUSADOR DA ANTRACNOSE E SINTOMAS DA DOENÇA

O agente causal da antracnose em sorgo é o fungo *Colletotrichum sublineolum* P. Henn. Até o início da década de 90, o agente causal da antracnose tanto em milho como em sorgo era descrito como sendo o fungo deuteromiceto *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson. Jamil e Nicholson (1989), utilizando isolados destas duas culturas, encontraram diferenças em relação ao crescimento radial da colônia, esporulação, geminação de esporos e virulência, quando cultivados em diferentes meios de cultivo. Vaillancourt e Hanau (1992) descreveram incompatibilidade sexual entre isolados das duas culturas, confirmando a diferença genética entre as duas espécies. Técnicas de análise de seqüências de RNA ribossomal (Sherrif *et al.*, 1995) e análises comparativas do tamanho, complexidade do genoma e conteúdo de CG entre isolados das duas culturas (Randhir & Hanau, 1997) permitiram concluir que isolados de milho e de sorgo tratam-se de espécies distintas. A partir de então, isolados de milho são classificados como *C. graminicola*, enquanto que os isolados de sorgo são designados *C. sublineolum*.

Esse patógeno incide nas folhas, pedúnculo, colmo, panícula, grãos e raízes. Sendo assim são descritas três fases da doença: a fase foliar, a podridão do colmo e a antracnose da panícula e dos grãos (Thakur & Mathur, 2000).

A antracnose foliar pode causar reduções acima de 50% na produção de grãos sob condições de epidemias severas, principalmente quando há alternância de condições secas e úmidas associadas a temperaturas elevadas, ocorrem em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Os sintomas típicos da antracnose foliar caracterizam-se pela presença de lesões elípticas a circulares, medindo até 5mm de diâmetro. Nessas manchas desenvolvem-se pequenos centros circulares de coloração palha a cinza, com margens avermelhadas, alaranjadas púrpura-escuras ou castanhas, dependendo da cultivar. Sob condições de alta umidade e precipitação, as manchas aumentam em número, tamanho e coalescem, cobrindo a maior parte da folha. No centro das lesões formam-se numerosos acérvulos onde há a formação de uma massa de coloração creme a salmão, resultantes da produção de esporos e setas negras (Casela & Ferreira, 2001). Os acérvulos, estruturas de frutificação do patógeno, apresentam coloração marrom escura, formato circular ou oval e medem de 70-300µm. Os conidióforos são curtos, eretos, hialinos, não septados e não ramificados. As setas são longas e septadas, com comprimento de 100µm e são formadas entre os conidióforos (Casela & Ferreira, 1998).

A fase de podridão do colmo e pedúnculo ocorre principalmente a partir da maturação das plantas e, normalmente, é causada por conídios produzidos na fase foliar da doença. Esses órgãos infectados adquirem, internamente, uma coloração avermelhada ou amarelada, com pontuações brancas correspondentes aos pontos de penetração do fungo (Ferreira & Casela, 2003).

A antracnose da panícula e dos grãos é também causada por conídios produzidos durante a fase foliar da doença, os quais são levados à bainha das folhas pela água da chuva. A infecção da panícula também pode ser uma extensão da fase de podridão do colmo da antracnose. A antracnose da panícula é caracterizada por lesões formadas abaixo da epiderme, que tem inicialmente um aspecto encharcado, adquirindo, mais tarde, uma coloração cinza a púrpura-avermelhada. As sementes produzidas podem também apresentar-se infectadas, nesse caso, exibem estrias castanho-escuras a pretas. Tais sementes não germinam ou podem dar origem a plântulas doentes (Casela & Ferreira, 1998).

*Colletotrichum sublineolum* pode sobreviver como esclerócios (Casela & Frederiksen, 1993), micélio e conídios em restos de cultura e em sementes infectadas. A disseminação do patógeno ocorre através de vento e de

respingos de chuva (Casela *et al.*, 2003). O controle mais eficiente desta doença é obtido pelo emprego de cultivares resistentes. Tal medida é, entretanto, dificultada pela alta variabilidade apresentada pelo patógeno, o que possibilita sua adaptação aos genes de resistência do hospedeiro, através do desenvolvimento de novas formas de virulência (Casela & Ferreira, 1987).

*Colletotrichum sublineolum*, e *C. graminicola*, apresentam dois tipos de conídios, os chamados conídios falcados e os conídios ovais. Em *C. graminicola* o falcado é produzido blasticamente a partir de células conidiógenas morfologicamente distintas, e o oval, de tamanho variado, porém menor que o conídio falcado, é produzido blasticamente a partir de hifas nas quais faltam células conidiógenas diferenciadas. Ambos os conídios causam sintomas em plantas de milho e são observados tanto em cultura quanto em lesões de folhas infectadas (Panaccione *et al.*, 1989).

Em *C. sublineolum* conídios falcados ou também conhecidos como falciformes, podem ser obtidos em meio de cultura sólido e na superfície das lesões. Os conídios ovais, descritos recentemente por Souza-Paccola *et al.*, 2003a) foram observados somente em meio de cultura submersa e/ou areada. Ambos os conídios demonstraram ser patogênicos, embora tenham sido relatadas diferenças quanto à virulência entre estes dois tipos de conídios. Observou-se ainda que células de conídios falciformes são uninucleadas, enquanto que células de conídios ovais são polinucleadas, variando de um a três núcleos por célula (Souza-Paccola *et al.*, 2003a).

### **1.3 TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL GENÉTICO EM *C. SUBLINEOLUM***

Os mecanismos de transferência de material genético usados pelo *Colletotrichum sublineolum* são pouco conhecidos. Apesar de *C. sublineolum* ser facilmente cultivado em uma variedade de condições, vantagem que o torna um organismo adequado para estudos fisiológicos e bioquímicos, poucas análises genéticas têm sido relatadas sobre essa espécie (Souza-Paccola *et al.*, 2003b). Presumivelmente isto seja influenciado pelo fato de que o seu estágio sexual é raro e não foi observado na natureza (Vaillancourt & Hanau, 1991).

Na reprodução sexual as espécies seguem uma das três estratégias básicas: homotalismo, pseudohomotalismo e heterotalismo. Linhagens homotáticas e pseudohomotáticas podem ser auto-férteis, e estas últimas ainda podem cruzar com outro indivíduo de sua espécie para completar o ciclo de vida. As linhagens heterotáticas, requerem contribuições de dois parentais distintos geneticamente para êxito no cruzamento sexual (Leslie & Klein, 1996). Nas espécies heterotáticas as linhagens realizam o cruzamento entre aquelas compatíveis que ocorre mediante mecanismos genéticos de reconhecimento molecular de incompatibilidade. Este sistema é conhecido como *Sistema Mating Type* e os genes que determinam a incompatibilidade sexual em fungos estão localizados em um ou mais complexos *loci* conhecidos como *locus mating type (locus MAT)*. Variantes diferentes do mesmo gene recebem o nome de alelos, mas, quando as regiões de um *locus* têm tamanho, seqüência de DNA e origem evolutiva diferentes, são chamadas de idiomorfos. Cada idiomorfo pode conter mais de uma seqüência codificadora de proteínas (Ferreira, 2005)

O *Mating type* em ascomicetos, zigomicetos e oomicetos é governado por um único locus *mating type* com duas formas distintas. A maioria dos basidiomicetos possui múltiplos *mating types* determinados por um, dois ou três diferentes *loci* genéticos cada qual podendo ter duas ou mais formas diferentes (Rapper 1966; Hiscock 1999).

A primeira caracterização molecular do *locus mating-type (MAT)* foi realizada nos anos 80, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Astell *et al.*, 1981), o que auxiliou em muito a compreensão dos sistemas de acasalamento em outros fungos. Na natureza, essa levedura apresenta autofertilidade, mas existem linhagens de laboratório que perderam essa capacidade e se tornaram auto-estéreis (heterotáticas). Nesse caso, existem indivíduos 'a' ou 'α', que têm os idiomorfos MATa e MATα, respectivamente (Ferreira, 2005).

Todos os MAT idiomorfos de ascomicetos codificam proteínas com regiões conservadas (homeodomínios), o que sugere que os genes MAT codificam produtos reguladores e controlam a expressão de alguns genes necessários para a reprodução sexual (Turgeon, 1998). Acredita-se que o reconhecimento de parceiros compatíveis envolve dois mecanismos genéticos interligados. O primeiro mecanismo a ser ativado opera através de ferormônios e receptores de ferormônios que desencadeiam um sinal que leva a ativação do segundo mecanismo e a ativação de

genes reguladores do sistema sexual. O segundo mecanismo envolve o reconhecimento e a interação molecular de dois homeodomínios de proteínas (HD1 e HD2) para gerar uma proteína heterodimérica com função de regulador da transcrição (Casselton 1998; Hiscock 1999; Kues 2000; Casselton 2002).

Genes MAT podem ser usados como ferramentas para estudos sobre a evolução das estratégias de reprodução, assim como a própria sexualidade (Arie *et al.*, 1997). Apesar de haver pouca similaridade entre os genes MAT de diferentes gêneros e, em alguns casos, entre espécies do mesmo gênero, as proteínas que esses genes codificam, como já citado anteriormente, possuem regiões muito conservadas (Arie *et al.*, 1997). Um maior conhecimento do sistema de *mating-type* é muito importante levando-se em consideração o papel da reprodução sexual no ciclo de vida dos fungos e a influência do sexo na genética de populações e evolução. (Kronstad & Staben, 1997).

Fungos do gênero *Colletotrichum* tem como teleomorfo fungos do gênero *Glomerella* (Freeman *et al.*, 1998), no entanto nenhuma referência do estado sexual em *C. sublineolum* foi até o presente encontrada na literatura. Em *C. graminicola* (Politis, 1975) foi relatado a existência do ciclo sexual sendo o seu estado teleomorfo a *Glomerella graminicola*. Vaillancourt e Hanau (1991) confirmaram a existência do ciclo sexual em *C. graminicola* indicando sua ocorrência na natureza, em baixa frequência. Os autores ainda demonstraram que a fertilidade entre isolados de *G. graminicola* varia muito e a produção de peritécio é altamente sensível a condições ambientais, tais como, luz, temperatura e umidade.

Um ciclo alternativo, o ciclo parassexual, foi descrito em *C. sublineolum* por Souza-Paccola *et al.* (2003b). Este mecanismo, que representa uma importante fonte de variabilidade em fungos fitopatogênicos, pode ser responsável, pelo menos em parte, pela transferência de material genético e pela alta variabilidade presente em *C. sublineolum*.

#### **1.4 MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELA VARIABILIDADE PATOGÊNICA E INSTABILIDADE EM *C. SUBLINEOLUM***

Apesar do desconhecimento de um estágio sexual em *C. sublineolum*, observa-se uma alta variabilidade genética na espécie. O ciclo parassexual como já mencionado acima, foi descrito na espécie, porém ainda existem dúvidas em relação à importância dos processos de recombinação parassexuais nas populações naturais de fungos (Debets, 1998). Uma evidência direta da ocorrência natural dos processos parassexuais é fornecida pelo isolamento de linhagens diplóides somáticas em várias espécies de fungos, entre estas incluem: *Ustilago maydis*, *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Aspergillus niger* e *A.nidulans* entre outras (Caten, 1981). Na natureza a exemplo do que ocorre no laboratório, espera-se que os diplóides somáticos sofram processos espontâneos de recombinação mitótica e haploidização, mas estes eventos são de difícil observação sob condições naturais (Caten, 1981). No entanto Souza – Paccola et al. (2003a) relataram a transferência de material genético via processo parassexual entre linhagens portadoras de marcas de resistência de *C. sublineolum* quando inoculados em plantas de sorgo em casa de vegetação.

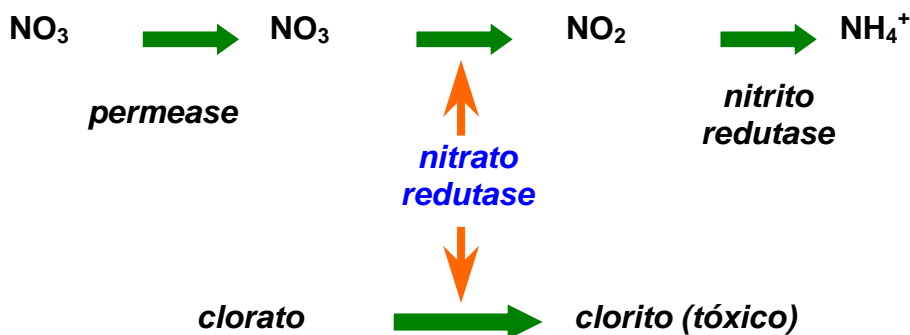
A alta instabilidade e variabilidade presente em *C. sublineolum* têm gerado uma redução na durabilidade e na estabilidade da resistência genética dos cultivares, a principal estratégia para o controle da antracnose (Ali & Warren 1987; Bressan & Figueiredo, 2003). No Brasil, a quebra de resistência devido ao surgimento de novas raças do patógeno tem sido observada em vários cultivares (Ferreira & Casela, 1986; Casela & Ferreira, 1987). Resultados de estudos de reversão de um estado de virulência para um de avirulência comprovaram a instabilidade patogênica de *C. sublineolum* obtido tanto em lesões como em culturas monoconidiais (Casela & Frederiksen, 1993).

Há também indicações de que apesar da alta variabilidade apresentada pelo patógeno, existem limitações à sua capacidade de adaptação, impostas, aparentemente, pelo acúmulo de genes de virulência (Costa *et al.*, 2003).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a elevada variabilidade patogênica e instabilidade em *C. sublineolum*. Além da heterocariose, recombinação sexual e parassexual, foi sugerido o envolvimento de elementos

genéticos de transposição (Casela & Frederiksen, 1994). A presença destes elementos em *C. sublineolum* foi avaliada pelo uso de mutantes para o gene da nitrato redutase (Fávaro, 2004). Mutações no *locus* estrutural da enzima nitrato redutase tem sido utilizadas como ferramenta para o isolamento e caracterização de transposons em diferentes espécies de fungos patogênicos (Daboussi *et al.*, 1992; Langin *et al.*, 1995; Glayzer *et al.*, 1995; Daboussi, 1996; Amutan *et al.*, 1996; Levis *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1997; Kempken & Kück, 1998; Gómez-Gómez *et al.*, 1999).

Estes mutantes podem ser isolados através da resistência ao clorato, um análogo tóxico do nitrato (Cove, 1976; Cove, 1979; Tomsett & Garrett, 1980; Marzluf, 1981; Marzluf, 1985; Crawford & Arst, 1993). Eles também podem conter alterações em outros loci estruturais ou reguladores do catabolismo do nitrato ou vias relacionadas e são denominados mutantes *nit*.



**Figura 1** – A bioquímica da conversão de nitrato a íons amônio. A enzima nitrato redutase reduz nitrato a nitrito mas também pode reduzir clorato a clorito, o qual é tóxico para a célula. Caso ocorra alguma alteração no gene da nitrato redutase, a célula não será capaz de utilizar nitrato e em contrapartida será resistente ao clorato.

A terminologia genética utilizada neste trabalho para classificar os mutantes *nit* segue a nomenclatura proposta por Yoder *et al.* (1986) para fungos fitopatogênicos que foi a nomenclatura utilizada por Brooker *et al.* (1991) para descrever mutações semelhantes em outras espécies de *Colletotrichum*. Correl *et al.* (1987) a utilizou ao recuperar mutantes *nit* em *Fusarium oxysporum*. Esta

terminologia também foi utilizada por Vaillancourt & Hanau (1994) para estudar a compatibilidade vegetativa e heterocariose em *C. graminicola*.

Linhagens designadas como *nit1* pertencem a classe fenotípica com mutação em um único *locus*, o *locus* estrutural da nitrato redutase. Mutantes da classe **NitM** resultam de uma mutação em um de vários loci responsáveis pela produção de um cofator contendo molibdênio, necessário para atividade das enzimas nitrato redutase e purina desidrogenase (Figura 01).

## 1.5 PROTOPLASTOS

A obtenção de protoplastos de células fúngicas, utilizando-se de várias enzimas degradadoras de parede celular, tem sido o método mais comum para se preparar células competentes para estudos genéticos de espécies em que o ciclo sexual não foi identificado ou não existe, assim como estudos de transformação e cariotipagem molecular. Estas células desprovidas de parede podem ser obtidas de diferentes tipos celulares, sendo em geral, obtidas a partir de micélio jovem ou conídios germinados ou não; algumas vezes, basidiósporos podem ser usados, como no caso de *Agaricus* (Fincham, 1989). No entanto, a escolha do tipo celular a ser utilizado na obtenção dos protoplastos é uma questão de conveniência, considerando as possibilidades de melhores resultados (Mullins & Kang, 2001).

Usualmente, a remoção da parede celular ocorre pela ação de enzimas líticas, em meio osmoticamente balanceado. Além da espécie fúngica e do tipo de célula utilizada, a liberação de protoplastos depende de fatores como, composição do meio de cultivo; estado fisiológico da cultura; (tipo e a concentração da enzima lítica; tipo e concentração do estabilizador osmótico; tempo de digestão; pH e temperatura do sistema (Marchi *et al.*, 2006). Após o isolamento, quando em meio nutritivo apropriado, os protoplastos são capazes de regenerar a parede celular, dando origem ao micélio. Contudo, as taxas de regeneração variam de organismo para organismo, geralmente não atingindo 100 % (Peberdy, 1995).

Avaliar as condições para obtenção de um número adequado de protoplastos é fundamental para estudos de fusão de protoplastos, sistemas de transformação genética e determinação de cariótipo molecular. A fusão de

protoplastos possibilita a obtenção de recombinantes entre diferentes linhagens, espécies, gêneros (Lynch *et al.*, 1989) e até mesmo entre eucariontes e procariontes (Azevedo, 1986). Redman & Rodriguez (1994) estudaram vários fatores que poderiam afetar a eficiência de transformação em algumas espécies de *Colletotrichum*. Mais recentemente, protoplastos obtidos de *C. lindemuthianum* foram utilizados para realizar uma rápida e eficiente extração de DNA em fungos filamentosos (Roca *et al.*, 2003b).

A protoplastização seguida da fusão de protoplastos abriu novas perspectivas para o melhoramento e elucidação dos mecanismos genéticos que governam a virulência e patogenicidade em fungos fitopatogênicos (Paccola-Meirelles, 1989; Thon, 2000).

Protoplastos de algumas espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido obtidos e utilizados em estudos genéticos. Podem ser citadas as espécies, *C. graminicola* (Panaccione *et al.*, 1988), *C. lindemuthianum* (Rodriguez & Yoder, 1987), *C. gloeosporioides* (TeBeest & Weidemann, 1990), *C. trifolii* (Yang & Dickman, 1999) e *C. acutatum* (Chunga *et al.*, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os fatores ambientais e genéticos necessários para a indução do ciclo sexual em *C. sublineolum* e adequar métodos alternativos para estudos de recombinação na espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar e caracterizar os fatores que poderiam influenciar ou induzir o ciclo o ciclo sexual do fungo *C. sublineolum*;
- Avaliar a presença de *mating-type* na espécie;
- Determinar a metodologia adequada para a obtenção e regeneração de protoplastos para estudos de cariotipagem molecular e futuros estudos de fusão de protoplastos;
- Caracterizar linhagens de *C. sublineolum* através da morfologia, conidiação e produção de estruturas de resistência.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS DE *COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM*

Foram utilizadas linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* (Tabela 01). As linhagens selvagens foram obtidas da coleção de cultura do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo – Embrapa Sete Lagoas/MG-Brasil. As linhagens mutantes, para o gene da nitrato redutase, utilizadas foram as obtidas por Fávoro (2004), depositadas no banco de linhagens do Laboratório de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR-Brasil.

As linhagens selvagens foram mantidas em meio Batata Dextrose Agar e as linhagens mutantes em meio para manutenção de mutantes *nit* (Fávoro *et al.*, 2007). As linhagens foram incubadas à 25°C sob luz contínua por sete dias e mantidas neste mesmo meio em geladeira.

**Tabela 1** – Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho

<b>Linhagem</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Origem</b>
30C	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
85.02	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
204.01	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
15A.109	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15A.124	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15A.162	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.04	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.11	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.15	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.20	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.23	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.12	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.12.1	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.22.2	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.17	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.41	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.67	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.74	Mutante Nit M	
15E.11	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
15E.15	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.12	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.122	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.151	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)

**Legenda:** *nit1*=mutação no locus estrutural da nitrato redutase. **NitM**= mutação em um dos *loci* responsáveis pela produção de um co-fator contendo molibdênio, necessário para a atividade das enzimas nitrato redutase e purina desidrogenase.

### 3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

#### 3.2.1 Caldo Batata Dextrosado (BD)

Potato Dextrose Broth (HIMEDIA M043)

#### 3.2.2 Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Potato Dextrose Ágar (HIMEDIA M096)

#### 3.2.3 Meio Aveia-Ágar

Aveia	50g
Ágar	15g

O volume foi completado para 1000mL com água destilada.

#### 3.2.4 Meio Mínimo (Pontecorvo *et al*, 1953)

NaNo <sub>3</sub>	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g
KCl	0,5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5g
FeSO <sub>4</sub>	0,01g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01g
Glicose	10g
Ágar	15g

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N e o volume foi completado para 1000mL com água destilada.

### **3.2.5 Meio Completo (Pontecorvo *et al*, 1953)**

Foi acrescentado ao meio mínimo (item 3.2.4):

Peptona	2g
Caseína hidrolizada	1,5g
Extrato de levedura	0,5g
Solução de Vitaminas	1mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N e o volume foi completado para 1000mL com água destilada.

Obs: Para o preparo dos meios líquidos, não foi acrescentado àgar.

### **3.2.6 Meio Completo para a manutenção de mutantes *nit***

O meio completo foi preparado como descrito no item 3.2.5, substituindo o NaNO<sub>3</sub> por Glutamato de Sódio 1,87g/L.

### **3.2.7 Meio Completo com estabilizador osmótico**

O meio completo foi preparado conforme item 3.2.5 ou 3.2.6 em dupla concentração e diluído na proporção de 1:1 com o estabilizador osmótico - ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2M pH 5,8 ) no momento do uso.

### 3.2.8 Meio Ágar-Sabourand

Peptona	10g
Dextrose	40g
Ágar	20g

O volume foi completado para 1000mL com água destilada.

### 3.2.9 Meio Cenoura-Agar (CA) (Tuite, 1969)

Cenoura triturada	20g
Àgar	15g

A cenoura foi triturada e deixada por uma hora em 500mL de água destilada. Após esse período foi fervida por 5 minutos. A solução foi filtrada em gaze. Ao filtrado foi acrescentado o agar e o volume foi completado para 1000mL com água destilada.

### 3.2.10 Meio Suco de Tomate

Suco de tomate (Superbom)	200mL
CaCO <sub>3</sub>	15g
Àgar	15g

O volume foi completado para 1000mL com água destilada.

### 3.2.11 Meio Àgar-Água acrescido de folhas de sorgo

Ágar	15g
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

Folhas de sorgo – linhagem BR009 - obtidas em casa de vegetação, foram lavadas com sabão neutro, cortadas em pedaços de 2 a 3 cm<sup>2</sup> e autoclavadas em água destilada. Meio agar-água (20mL) foi vertido em placas de petri e após a solidificação os segmentos foliares foram cuidadosamente depositados sobre o meio.

### 3.2.12 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100mg
Ácido p-Aminobenzóico	10mg
Biotina	0,2mg
Piridoxina	50mg
Riboflavina	10mg
Tiamina	50mg

O volume foi completado para 100mL com água destilada autoclavada. O frasco onde foi guardada a solução foi previamente autoclavado, assim como a água destilada. A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e estocada em frasco escuro a 4°C.

### 3.2.13 Solução de Biotina

Biotina	0,004g
H <sub>2</sub> O destilada	100mL

A água destilada foi autoclavada previamente. A solução foi fervida em banho-maria por 15 minutos e estocada em frasco escuro à 4°C.

#### **3.2.14 Solução Salina 0,85% (p/v)**

NaCl	8,5g
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

A solução foi distribuída em frascos, 9mL cada, e autoclavada. A solução foi mantida à 4°C.

#### **3.2.15 Solução de Tween 80 0,1% (v/v)**

Tween 80	0,1mL
H <sub>2</sub> O destilada	100mL

A solução foi distribuída em tubos de ensaio, 2,5mL cada, autoclavada e mantida à 4°C.

#### **3.2.16 Ácido Etilenodinitrilotetracético Sal Dissódico (EDTA) 0,5M pH 8,0**

EDTA	182,012g
------	----------

O EDTA foi dissolvida em 200mL de água destilada. Ajustou-se o pH com NaOH (pastilhas), no agitador, até atingir o pH 8,0. Depois que o EDTA foi dissolvido completamente o volume foi ajustado para 1000mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

### 3.2.17 Tampão Tris-HCl pH 8,0 1M

Trizma base	121,14g
-------------	---------

O Trizma base foi dissolvido em 200mL de água destilada. Ajustou-se o pH com HCl, no agitador, até atingir o pH 8,0. Depois que o Trizma foi dissolvido completamente o volume foi ajustado para 1000mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

### 3.2.18 Clorofane

Foram misturados um volume de clorofórmio para um volume de fenol (1:1).

### 3.2.19 Clorofil

O clorofórmio e o álcool isoamílico formam misturados na proporção 24:1 (v/v).

### 3.2.20 Tampão de Extração

TrisHCl 1M pH 8,0	4mL
EDTA 0,5M pH 8,0	1mL
NaCl 5M	1mL
SDS 10%	2mL
H <sub>2</sub> O destilada	12mL

A solução foi estocada em frasco escuro à temperatura ambiente.

### 3.2.21 Tampão de Corrida TEB 10X

Trizma base	108g
Ácido bórico $H_3BO_3$	55g
EDTA 0,5M pH 8,0	40mL

O volume foi completado para 1000mL com água destilada. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

### 3.2.22 Tampão de Amostra

Azul de bromofenol	25mg
Ficol	1,5mg
H <sub>2</sub> O destilada	10mL

Foi distribuído 1,5mL de tampão em tubos e estes foram mantidos à 4°C.

### 3.2.23 Tampão de McIlvaine's pH 5,8

Solução de ácido cítrico: 21g em 1000mL de água destilada.

Solução de  $Na_2HPO_4$ : 28,39g em 1000mL de água destilada.

Foram misturadosi misturado 368,5 mL da solução de ácido cítrico e 631,5 mL de  $Na_2HPO_4$ . O tampão foi autoclavado e mantido a 4°C.

### 3.2.24 Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2M pH 5,8

Foram dissolvidos 158,4g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 300mL de Tampão de Mcllvaine's. O pH foi ajustado para 5,8 com a solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e o volume foi completado para 1000mL com o Tampão de Mcllvaine's. A solução foi autoclavada e mantida à 4°C.

### 3.2.25 Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M pH 5,8

A solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2M pH5,8 foi diluída na proporção de 1:1 em Tampão de Mcllvaine's pH5,8.

### 3.2.26 Gel de Agarose (0,7% e 1,4%)

Agarose (Invitrogen)	0,7g (0,7%) ou 1,4g (1,4%)
TBE 1X	100mL

### 3.2.27 Solução de Brometo de Etídio

Foi dissolvido 1,0% de brometo de etídio (p/v) em água destilada e agitado por 3 horas, a solução foi estocada em frasco escuro à 4°C.

### **3.3 ESTERILIZAÇÃO**

Os meios de cultura e soluções foram autoclavados por 15 minutos a 121°C e a 1 atmosfera de pressão.

### **3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA**

A produção de conídios ovais e falcados foi avaliada seguindo a descrição de Souza-Paccola *et al.*(2003a).

#### **3.4.1 Produção de Conídios Falcados**

Para estimar a produção de conídios falcados, discos de micélio, retirados das bordas das colônias, com 10mm de diâmetro foram inoculados em placas de Petri contendo meio Aveia Agar. Após 10 dias de cultivo as colônias foram raspadas com alças de metal para estimular a produção de conídios, e então incubadas por mais 7 dias a 25°C sob luz contínua. Após o período de incubação os conídios falcados foram coletados em uma solução de Tween 80 0,01%. O número de conídios falcados por colônia foi estimado em Câmara de Newbauer.

#### **3.4.2 Produção de Conídios Ovais**

A produção de conídios ovais foi avaliada cultivando-se três discos de micélio, com 10mm de diâmetro cada, em 50mL do meio caldo batata dextrosado. As culturas foram mantidas sob agitação (90 rpm.) por 7 dias à 25°C com fotoperíodo de 12hs. Após a incubação o cultivo foi filtrado em oito camadas de gaze esterilizada para a retirada do micélio, e o filtrado foi centrifugado a 4.000

r.p.m. por 10 minutos. Os conídios foram então lavados em água destilada esterilizada. A produção de conídios foi estimada em Câmara de Neubauer.

O tamanho dos conídios ovais em cada linhagem foi estimado com o auxílio do Motic Images 2000.

### **3.4.3 Avaliação do Crescimento Vegetativo**

A avaliação do crescimento vegetativo foi realizada inoculando-se discos miceliais de 10mm de diâmetro, no centro de placas de petri contendo meio Aveia Agar e incubado à 25°C sob luz contínua. As medidas do diâmetro da colônia foram efetuadas a cada 48 horas. Também foram monitoradas características morfológicas, como cor da colônia e liberação de setores.

### **3.4.4 Produção, Germinação e Viabilidade de Esclerócios**

Para a avaliação da produção de esclerócios, 18 linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* foram inoculadas em meio agar-água acrescido de folhas de sorgo, com o acréscimo de solução de biotina (5µL/mL) e incubadas a 25°C sob luz contínua por 15 a 20 dias. Para avaliação qualitativa da produção foi estipulada uma nota de 0 a 3 onde, 0, nenhuma produção; 1, baixa produção; 2 média produção; e 3 alta produção de esclerócios. Também foi observada a produção de acérvulos e quando estes estavam presentes, se possuíam ou não setas, assim como a produção de conídios falcados nos acérvulos ou entre o micélio.

Para a verificação do tempo de germinação, esclerócios foram inoculados em lâminas de vidro contendo uma fina camada de BDA e em placas de petri contendo meio BDA onde foram depositadas membranas de celofane autoclavadas (2-3cm<sup>2</sup>). A germinação dos esclerócios foi monitorada a cada 6hs durante 48 horas em microscópio óptico.

Para os testes de viabilidade germinativa, esclerócios foram produzidos conforme descrito acima, e mantidos nas temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 5, 10, 15 e 20 dias. Após este período, foram retirados e inoculados em meio BDA e a viabilidade confirmada pela germinação e formação de colônia.

Esclerócios também foram avaliados em relação a fatores influenciadores da germinação tais como temperaturas, aeração e presença de luz. Para isso, 50 esclerócios foram inoculados em placa de petri contendo meio BDA. Estes foram incubados nas temperaturas nas seguintes condições:  $37^{\circ}\text{C}$  em placas vedadas e não vedadas no escuro, a  $25^{\circ}\text{C}$  sob luz contínua em placas vedadas e não vedadas e  $25^{\circ}\text{C}$  no escuro com placas vedadas e não vedadas.

### **3.5 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Para a extração de ácidos nucleicos as linhagens foram crescidas em BD, por 7 dias sob agitação (90rpm) a  $25^{\circ}\text{C}$ . O micélio foi filtrado em gaze, lavado com água destilada esterilizada e pesado. O micélio foi macerado com nitrogênio líquido e transferido para um tubo e para cada 0,5g de micélio foram adicionados 800 $\mu\text{L}$  de Tampão de extração (item 3.2.20). Essa mistura foi incubada por 20 minutos em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, foi adicionado 800 $\mu\text{L}$  de fenol, as fases foram misturadas e centrifugadas a 12.000rpm por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para outro tubo, onde foi acrescentado igual volume de clorofane. Foi misturado por inversão cuidadosa e centrifugado por 15 minutos a 12.000rpm. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo e a ela foi adicionado igual volume de clorofil e repetiu-se a centrifugação anterior. Para a precipitação do DNA a fase aquosa foi transferida para um tubo contendo 2 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de NaCl 3M. O tubo foi incubado por uma hora em freezer e então centrifugado por 5 minutos a 12.000rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 300 $\mu\text{L}$  de etanol 70% e repetiu-se a centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do DNA à temperatura ambiente este foi ressuspendido em 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

O DNA extraído foi quantificado com o auxílio de fluorímetro e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 0,7%. O DNA extraído foi mantido a 4°C.

### 3.5.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Todas as reações foram preparadas segundo o descrito em Arie *et al.* (1997) com algumas modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 20ng de DNA; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25mM de dNTP; 2,0mM de cada primer (primerF – forward e primerR – reverse); 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 10mM de Tampão Tris-HCl pH8,3 e 50mM de KCl. As reações para o par de primers NcHMG (5' CC(CT)CG(CT)CC(CT)CC(CT)AA(CT)GCTA(CT)AT 3' e 5' CGGG(AG)TT(AG)TA(AG)CG(AG)TA(AG)T(AG)GG 3', respectivamente) (Imprint Genetics Corporation) foram realizadas nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 10 min à 72°C. Para as amplificações do conjunto de primers SkCM1 (5' GCAGATCTCCGCACTGGAGC 3' e 5' GCAGATCTGTCGTCGATGGT 3', respectivamente) (Imprint Genetics Corporation) as condições foram: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 10 min à 72°C. Para o par de primers HMGgram (5' CGTATATTCTCTACCGCAAGG 3' e 5' GGGGGTGCAGTTTGTATG 3', respectivamente)(Invitrogen Brazil LTDA) as amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 50 segundos e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 10 min à 72°C. Todas as reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.).

Para a análise dos produtos das PCRs, 15µL de cada reação foram submetidos em gel de agarose à 1,3%.

### 3.6 TESTES DE COMPATIBILIDADE SEXUAL

Para a realização de testes de compatibilidade sexual linhagens selvagens e mutantes *nit* de *C. sublineolum* foram pareadas entre si, respeitando as reações de compatibilidade vegetativa (Fávaro, 2004) assim como as reações de compatibilidade sexual resultantes das análises de PCRs para o gene de *mating-type*. Os cruzamentos foram realizados em diferentes meios de cultura, temperatura e metodologia de inóculo, conforme descrito abaixo.

*Meios de cultivo como fator de indução do ciclo sexual.* Os pares formados foram inoculados a uma distância de 1-2 cm um do outro em diferentes meio de cultivo. Os meios utilizados nos cruzamentos (Cenoura-ágar, Ágar Sabourand, Suco de Tomate, Meio Mínimo e meio ágar-água acrescido de folhas de sorgo) tiveram seus pHs ajustados para 6,8. Os cruzamentos foram incubados sob luz contínua à 25°C

*Acidez (pH) como fator de indução.* Os pares formados foram inoculados nos meios Cenoura-ágar e Ágar Sabourand com pH 5,0 e incubados à 25°C sob luz contínua.

*Luz e temperatura como fator de indução.* Os pares de linhagens foram inoculados em Meio Mínimo e Meio Cenoura-ágar pH 6,8 As condições de incubação foram:

1. sob luz continua à 25°C
2. com foto período de 12hs à 25°C
3. na ausência total de luz à 25°C
4. na ausência total de luz à 37°C.

*“Plug” (Bowden & Leslie, 1998).* Os pares foram inoculados colocando-se um plug de cada uma das duas linhagens em placas contendo meio BDA ou Cenoura-ágar a uma distância aproximada de 2-3cm e incubados por 7 dias à 25°C sob luz contínua. Após esse período, 2mL de Tween 80 0,1% foi acrescentado à placa e o micélio foi levemente raspado, com alça de vidro, a fim de

transferir os conídios falcados de uma linhagem para a outra e produzir um leve choque mecânico no micélio. Após a raspagem, as placas voltaram a ser incubadas nas mesmas condições.

*“Mixed-inoculum” (Bowden & Leslie, 1998).* Suspensões de conídios falcados em Tween 80 0,1% foram preparadas na concentração de 1 a  $2 \times 10^4$  conídios/mL. Foram inoculadas 0,1mL dessa suspensão, de cada uma das duas linhagens do par, em placas de petri contendo meio BDA e em placas contendo Cenoura-ágar. Estas foram incubadas à 25°C sob luz contínua por 7 dias. Após o sétimo dia, 2mL de Tween 80 0,1% foi acrescentado à placa e o micélio foi levemente raspado com alça de vidro. Após a raspagem as linhagens voltaram a ser incubadas nas mesmas condições.

*“Spermatization method” (Bowden & Leslie, 1998).* Uma das linhagens do par (P1) foi inoculada em meio BDA e também em meio Cenoura-ágar e incubada por 7 dias à 25°C sob luz contínua. Após esse período uma suspensão de conídios falcados em Tween 80 0,1% da outra linhagem do par (P2) na concentração de  $10^5$  à  $10^6$  conídios/mL foi preparada. Com o auxílio de alça de vidro, 2mL dessa suspensão foram plaqueados na placa contendo micélio da linhagem P1. Após o inóculo as placas voltaram a ser incubadas nas mesmas condições.

*Obtenção de heterocário (Souza-Paccola, 2002).* Suspensões de conídios falcados na concentração de  $10^6$  conídios/mL provenientes das duas linhagens do par, foram inoculadas em um tubo contendo 2,5mL de meio mínimo líquido acrescido de 4% de meio completo líquido. Após 10 dias de incubação à 25°C houve a formação da película heterocariótica. Esta foi transferida para uma placa contendo meio mínimo sólido para a formação do heterocário.

### 3.7 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS

O protocolo para a obtenção de protoplastos de *C. sublineolum* foi otimizado a partir daquele descrito por Thon *et al.* (2000) e Barcellos (2002). Para a obtenção dos protoplastos a partir de pontas de hifa, o micélio de cada linhagem foi raspado com alças de metal, de forma a se obter pequenos fragmentos de micélio, e estes foram inoculados em frascos contendo 50mL de meio BD. Os inóculos foram incubados por 18h, à 25°C  $\pm$  2 sob agitação (90rpm). Após esse período o micélio foi filtrado em filtro de gaze (oito camadas de gaze) e lavado com solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 abundantemente para a retirada de conídios. O peso úmido do micélio de cada linhagem foi estimado. Para cada mg de micélio foi adicionado 20  $\mu$ L de solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 e adicionada a Enzima Lítica (Lysing enzyme – Sigma) ou Glucanex (beta-glucanase - Novozymes) na proporção de 5% do peso do micélio. Incubou-se por 2 ½ horas à 3 horas sob agitação (90rpm) à 25°C  $\pm$  2. Após a protoplastização, a solução foi filtrada em funil com oito camadas de gaze a baixo de uma camada de lã de vidro. O filtrado foi centrifugado por 30 minutos à 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 5mL solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 e centrifugado por 10 minutos à 6000 rpm. O processo foi repetido mais uma vez. O número de protoplastos foi estimado em câmara de Neubauer.

Para a obtenção de protoplastos a partir de esporos ovais, três discos de micélio (10 mm de diâmetro) de cada linhagem foram inoculados, em 50mL do meio BD. As culturas foram mantidas sob agitação (90 rpm) por 48h à 25°C fotoperíodo de 12hs. Após a incubação o material foi filtrado em oito camadas de gaze esterilizada para a retirada do micélio, e o filtrado foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os conídios foram ressuspendidos em água destilada esterilizada e novamente centrifugados. O mesmo processo foi repetido ressuspendendo os conídios em solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 e novamente centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, o número de conídios ovais foi estimado em Câmara de Neubauer e os mesmos foram ressuspendidos em solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 afim de obter-se uma concentração de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> conídios/mL. Para cada mL da suspensão foram adicionados 10mg, 25mg ou 50mg da Enzima lítica (Lysing enzyme – Sigma). Quando a enzima utilizada foi a Glucanex

(beta-glucanase) (Novozymes) as concentrações testadas foram de 10mg, 50mg e 100mg. Após o acréscimo da enzima as soluções foram incubadas por 2 a 3h sob agitação (90 rpm) à 25°C ± 2. Após esse período os protoplastos foram lavados como descrito anteriormente e o número de protoplastos foi estimado em câmara de Neubauer.

### 3.7.2 Regeneração de Protoplastos

A regeneração dos protoplastos foi realizada segundo protocolo descrito por Paccola-Meirelles (1988). Para a regeneração foram preparadas placas de petri com 15mL de meio completo acrescido de estabilizador osmótico. Os protoplastos obtidos foram diluídos em solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 e 100 µL dessa suspensão foram plaqueados em placas de petri com 15mL de meio completo com estabilizador osmótico. O mesmo procedimento foi utilizado com meio completo sem estabilizador osmótico. Para protoplastos obtidos de linhagens mutantes foi utilizado o meio completo para manutenção de mutantes *nit*.

O número de colônias em meio completo mais estabilizador osmótico indica o número de conídios, fragmentos de hifas viáveis e protoplastos regenerados. No meio controle (meio completo sem estabilizador osmótico) ocorre o crescimento apenas de conídios e fragmentos de hifas viáveis. A diferença no número de colônias entre estes dois meios possibilita o cálculo da frequência de regeneração de protoplastos, o qual pode ser realizado pela fórmula:

$$\% \text{ de regeneração} = \frac{a - b}{c} \times 100 \text{ onde,}$$

a = nº de colônias crescidas em meio completo com estabilizador osmótico

b = nº de colônias crescidas em meio completo (controle)

c = nº de protoplastos plaqueados da suspensão

## 4 CONCLUSÕES

- Uma alta variabilidade foi observada na produção de conídios ovais e falcados, variando de 0 à  $16,7 \times 10^5$  conídios/mL e 0 a  $19,08 \times 10^6$  conídios/mL, respectivamente.
- A variabilidade no crescimento radial das colônias foi freqüente, observando-se a liberação de setores espontaneamente por algumas linhagens, confirmando assim a alta instabilidade deste patógeno.
- Esclerócios foram produzidos pelas linhagens *in vitro*, fenômeno ainda não descrito nesta espécie.
- Não foi possível correlacionar o fenótipo mutante para auxotrofia, com as características morfológicas avaliadas.
- A caracterização das linhagens quanto a presença de genes MAT foi realizada por meio de PCRs e os genes de *mating type* foram amplificados demonstrando que ambos os idiomorfos, MAT1 e MAT2, estão presentes nesta espécie. Entretanto algumas linhagens não amplificaram para nenhum dos idiomorfos, indicando que talvez estas não possuam o gene MAT ou este não codifica uma proteína com uma região *alpha box* ou *HMG box*.
- Os testes realizados não foram suficientes para a identificação de qual(s) fator ambiental e/ou nutricional estaria envolvido na indução do ciclo sexual em *C. sublineolum*. Todas as linhagens estudadas foram auto-estéreis
- Neste trabalho, estabeleceu-se condições de isolamento e regeneração de protoplastos de linhagens selvagens e mutantes *nit* de *Colletotrichum sublineolum* com o objetivo de utilizá-las em estudos genéticos, tais como: cariotipagem molecular, fusão de protoplastos e de transformação genética.

## REFERÊNCIAS

- ALI, M.E.K. & WARREN, H.L. (1987). Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum, *Plant Disease*, **71**: 402-404.
- AMUTAN, M.; NYSSONEM, E.; STUBBS, J.; DIAZ-TORRES, M.R. & DUNN-COLEMAN, N. (1996). Identification and cloning of mobile transposon from *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Currents Genetics*, **29**: 468-473.
- ARIE, T.; CHRISTIANSEN, S.K.; YODER, O.C. & TURGEON, B.G. (1997). Efficient cloning of Ascomycetes mating type genes by PCR amplification of the conserved MAT HMG box, *Fungal Genetics and Biology*, **21**: 118-130.
- ASTELL, C.R.; AHLIS-JONASSON, L.; SMITH, M.; TATCHELL, K.; NASMYTH, K.A. & HALL, B.D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell*, **27**: 15-23.
- AZEVEDO, J.L. (1986). Melhoramento genético em microrganismos, *Ciência e Cultura*, **38**: 1161-1168.
- BARCELLOS, F.G. (2002). Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudogoningii*. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo, 23-39.
- BOWDEN, R. L. & LESLIE, J. F. (1999). Sexual recombination in *Gibberella zeae*, *Phytopathology*, **89**: 182-188.
- BRESSAN, W. & FIGUEIREDO, J.E.F. (2003). Controle biológico de raças e isolados de *Colletotrichum graminicola*, do sorgo, por Actinomicetos, *Embrapa milho e Sorgo* – Comunicado Técnico, **62**.
- BROOKER, N.L.; LESLIE, J.F. & DICKMAN, M.B. (1991). Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness, *Genetics*, **81**: 672-677.
- CARLILE, M. J & WATKINSON, S. C. (1997). *The Fungi*, Academic Press, 4ª Ed. London.

- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. (1987). Proposta de um sistema de classificação de raças de *Colletotrichum graminicola* agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*), *Fitopatologia Brasileira*, **12**: 337-344.
- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. (1998). Antracnose do Sorgo (*Colletotrichum graminicola*), *Embrapa Milho e Sorgo - Circular Técnica*, **28**: 07-19.
- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. (2001). Ataque ao sorgo, *Cultivar*, **5**: 6-8.
- CASELA, C.R. & FREDERIKSEN, R.A. (1993). Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues, *Plant Disease*, **77**: 825-827.
- CASELA, C.R.; FERREIRA, E.S.; FERNANDES, F.T. & PINTO, N.F.J.A. (2003). Doenças foliares do sorgo, *Embrapa Milho e Sorgo – Comunicado Técnico*, **72**.
- CASELA, C.R. & FREDERIKSEN, R.A. (1994). Pathogenic variability in monoconidial isolates of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* from single lesions and from monoconidial cultures, *Fitopatologia Brasileira*, **19**: 149-153.
- CASSELTON, L. A. & OLESNICKY, N. S. (1998). Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi, *Microbiology Molecular and Biological Reviews*, **62**: 55-70.
- CASSELTON, L. A. (2002). Mate recognition in fungi, *Heredity*, **88**: 142-7.
- CATEN, C.E (1981). Parasexual processes in fungi, In: Gull K, Oliver. SG (eds) *The fungal nucleus*. Cambridge University Press, 191-212.
- CHUNGA, K-R.; SHILTSA, T.; LIA, W. & TIMMERA, L.W (2002). Engineering a genetic transformation system for *Colletotrichum acutatum*, the causal fungus of lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus, *FEMS Microbiology Letters*, **213**: 33.
- COELHO, A.M.; WAQUIL, J.M.; KARAM, D.; CASELA, C.R. & RIBAS, P.M. (2002). Seja o doutor do seu sorgo, <http://www.cnpms.embrapa.br/sorgo/doutorsorgo.pdf>
- CORREL, J.C.; KLITTICH, C.J.R.& LESLIE, F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* an their use in vegetative compatibility tests, *Genetics*, **77**: 1640-1646.

COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; ZAMBOLIM, L. & FERREIRA, A.S. (2003). A Antracnose do sorgo, *Fitopatologia Brasileira*, **28**: 345-354.

COVE, D.J. (1976). Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants, *Heredity*, **36**: 191-203.

DABOUSSI, M.J. & GERLINGER, C. (1992). Parasexual cycle and genetic analysis following protoplast fusion in *Nectria haematococca*, *Current Genetics*, **21**: 385-392.

DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. & BRYGOO, Y. (1992). Fot 1, a new family of fungal transposable elements, *Molecular General Genetics*, **232**: 12-16.

DEBETS, A.J.M. (1998). Parasexuality in fungi: mechanisms and significance in wild populations. IN: Bridge, P.Y. Couteaudier and J. Clarkson (eds). *Molecular Variability of fungal pathogens*, CAB International, Wallingford, UK, 41-52.

FÁVARO, L.C.L. (2004). Instabilidade genética em *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 28-34.

FÁVARO, L.C.L.; ARAÚJO, W.L.; SOUZA-PACCOLA, E.A.; AZEVEDO, J.L. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. (2006). *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate, *Mycological Research*, **111**: 93-105.

FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. (1986). Raças patogênicas de *C. graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*), *Fitopatologia Brasileira*, **11**: 83-87.

FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. (2003). Podridão do colmo e do pedúnculo na cultura do sorgo, *Embrapa Milho e Sorgo – Comunicado Técnico*, **91**.

FERREIRA, A.V.B (2005). Fungos os primórdios do sexo. *Ciência Hoje*, **37**: 34-41.

FERREIRA, E.S.; CASELA, C.R. & FERNANDES, F.T. (1988). Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo – Doenças na cultura do sorgo, *Embrapa milho e Sorgo – Circular Técnica*, **1**: 53-69.

FINCHAM, J.R.S. (1989). Transformation in fungi, *Microbiological Reviews*, Washington, **53**: 148-170.

FREEMAN, S., KATAN, T. & SHABI, E. (1998). Characterization of colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits, *Plant Disease*, **82**: 596-605.

FREDERIKSEN, R.A. (1986). Compendium of sorghum diseases, *American Phytopathology Society*, **1**:11.

GLAYZER, D.C.; ROBERTS, I.N.; ARCHER, D.B. & OLIVER, R.P. (1995). Ant1, a transposable element from *Aspergillus niger*, *Molecular General Genetics*, **249**: 432-438.

HISCOCK, S.J. & KUES, U. (1999). Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi, *International Reviews of Cytology*, **193**: 165-295.

JAMIL, F.F. & NICHOLSON, R. (1989). Cultural studies on *Colletotrichum graminicola* isolates from shattercane, sorghum and corn, *Mycological Research*, **93**: 63-66.

KRONSTAD, J.W. & STABEN, C. (1997). Mating type in filamentous fungi, *Annual Review in Genetics*, **31**:245-276.

KUES, U. (2000). Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*, *Microbiology Molecular and Biological Reviews*, **64**: 316-53.

LESLIE, J.F. & KLEIN, K.K. (1996). Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi, *Genetics*, **144**: 557-567.

LESLIE, J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility, *Annual Reviews of Phytopathology*, **31**: 127-150.

LEVIS, C.; FORTINI, D. & BRYGOO, Y. (1997). Flipper, a mobile Tot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*, *Molecular General Genetics*, **254**: 674-680.

LYNCH, P.T.; ISAAC, S. & COLLIN, H.A. (1989). Uptake of protoplasts from the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Fusarium oxysporum* into protoplasts from celery (*Apium graveolens* L.), *Protoplasma*, **150**: 9-18.

MARCHI, E.D.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; QUEIROZ, M.V & MIZUBUTI, E.S.G. (2006). Isolation and regeneration of *Magnaporthe grisea* protoplasts, *Summa Phytopathologica*, **32**: 232-238.

MARZLUF, G.A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi, *Microbiological Reviews*, **45**: 437-461.

MARZLUF, G.A.; PERRINE, K.G. & NAHM, B.H. (1985). Genetic regulation of nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. In: *Molecular genetics of filamentous fungi*. W.E. Timberlake, (ed). Alan R. Liss, New York, 83-94.

MOORE-LANDECKER, E. (1982). *Fundamentals of the fungi*, Prentice-Hall, Inc. 2<sup>a</sup> Ed, New Jersey.

MULLINS, E.D. & KANG, S. (2001). Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants, *Cellular and Molecular Life Science*, **58**: 2043-2052.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. (1988). Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILL. . Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo.

PANACCIONE, D.G.; VAILLANCOURT, L.J. & HANAU, R.M. (1989). Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*, *Mycologia*, **81**: 876-883.

PANDE S.; MUGHOGHO L. K.; BANDYOPADHYAY R. & KARUNAKAR R. I. (1991). Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India, *Plant Disease*, **75**: 778-783

PANDE, S., THAKUR, R.P., KARUNAKAR, R.I., BANDYOPADHYAY, R. & REDDY, B.V.S. (1994). Development of screening methods and identification of stable resistance to anthracnose in sorghum, *Field Crops Research*, **38**: 157-166.

PEBERDY, J.F. (1995). Fungal protoplasts. In: *The Mycota II Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag. New York, 49-60.

POLITIS, D.J. (1975). The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*, *Mycologia*, **67**: 56-63.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BIFTON, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*, *Advances in Genetics*, **5**: 141-238.

RANDHIR, R.J. & HANAU, R.M. (1997). Size and complexity of the nuclear genome of *Colletotrichum graminicola*, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4001-4004.

REDMAN, R.S. & RODRIGUEZ, R.J. (1994). Factors affecting the efficient transformations of *Colletotrichum* species, *Experimental Mycology*, **18**: 230-246.

ROCA, G.M.; DAVIDE, L.C. & WHEALS, A.E. (2003). Template preparation for rapid PCR in *Colletotrichum lindemuthianum*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**: 8-12.

RODRIGUEZ, R.J. & YODER, O.C. (1987). Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *Phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*), *Gene*, **54**: 73-81.

RUAS, D.G.G.; GARCIA, J.C. & TEIXEIRA, N.M. (1988). Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo – Origem e importância do sorgo para o Brasil. Embrapa milho e Sorgo.

SANTOS, F.G. (2003). Cultivares de sorgo, Embrapa Milho e Sorgo – Comunicado Técnico, **77**.

SHERRIF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD G.M. & BAILEY, J.A. (1995). rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum sublineolum*, *Mycological Research*, **99**: 475-478.

SOUZA-PACCOLA, E.A. (2002). Recombinação genética em *Colletotrichum graminicola* isolados de sorgo. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

SOUZA-PACCOLA, E.A.; FÁVARO, L.C.L.; BOMFETTI, C.A.; MESQUITA, S.F.P. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. (2003a). Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*, *Journal of Phytopathology*, **151**: 383-388.

SOUZA-PACCOLA, E.A.; FÁVARO, L.C.L.; CASELA, C.R. & PACCOLA-MEIRELLES, L.D. (2003b). Genetic recombination in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Phytopathology*, **151**: 329-334.

SUTTON, B.C. (1980). The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata, Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 696p.

TeBEEST, D.O & WEIDEMANN, G.J. (1990). Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*, *Mycologia*, **82**: 249-255.

THAKUR, R. P. & MATHUR, K. Anthracnose. (2000). In: Frederiksen, R.A. & Odvody, G. (Eds.) Compendium of Sorghum Diseases. APS Press. St. Paul, 10-12.

THON, M.F.; NUCKLES, E.M. & VAILLANCOURT, L.J. (2000). Restriction Enzyme-Mediated Integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**: 1356-1365.

TOMSETT, A.B. & GARRET, R.H. (1980). The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **95**: 649-660.

TURGEON, B.G. (1998). Application of mating type technology to problems in fungal biology, *Annual Reviews of Phytopathology*, **36**: 115-137.

VAILLANCOURT, L.J. & HANAU, R.M. (1991). A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* from maize, *Phytopathology*, **81**: 530-534.

VAILLANCOURT, L.J. & HANAU, R.M. (1992). Genetic and Morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum, *Experimental Mycology*, **16**: 219-229.

VAILLANCOURT, L.J. & HANAU, R.M. (1994). Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokaryosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*), *Experimental Mycology*, **18**: 311-319.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A. & CRUZ, I. (2003). Manejo de pragas na cultura do Sorgo, *Embrapa milho e Sorgo – Circular Técnica*, **27**: 65.

YANG, Z. & DICKMAN, M.B. (1999). *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 430-439.

YODER, O.C.; VALENT, B. & CHUMLEY, F. (1986). Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi, *Phytopathology*, **76**:383-385.

**ARTIGO I**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOGENÉTICA DE LINHAGENS DE *COLLETOTRICHUM*  
*SUBLINEOLUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO SORGO. \***

\* Este capítulo será enviado para o periódico científico Journal of Phytopathology

**CARACTERIZAÇÃO MORFOGENÉTICA DE LINHAGENS DE *COLLETOTRICHUM*  
*SUBLINEOLUM*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO SORGO.**

Zanette, G.F<sup>1</sup>; Nóbrega G.M.A<sup>1</sup> & Paccola-Meirelles, L.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL –  
Paraná, Brasil.

\*Correspondência: Tel.: +55-43-3371-4417; Fax: +55-43-3371-4527

E-mail: [paccola@uel.br](mailto:paccola@uel.br)

## RESUMO

A antracnose do sorgo (*Sorghum bicolor* L.), causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* P. Henn, é uma das mais importantes doenças que afetam a cultura no Brasil, estando presente em todas as regiões de plantio no país. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfogeneticamente linhagens selvagens e mutantes para o gene da nitrato redutase em relação à morfologia, conidiação, produção de esclerócios e presença de genes para *mating* –*type*. Uma alta variabilidade foi observada na produção de conídios ovais e falcados, variando de 0 à  $16,7 \times 10^5$  conídios/mL e 0 a  $19,08 \times 10^6$  conídios/mL, respectivamente. A variabilidade no crescimento radial das colônias foi freqüente, observando-se a liberação de setores espontaneamente por algumas linhagens, confirmando a alta instabilidade deste patógeno. Esclerócios foram produzidos pelas linhagens *in vitro*, fenômeno ainda não descrito nesta espécie. As características de produção, germinação e desenvolvimento de esclerócios sob diferentes condições de temperatura, aeração e luz, foram avaliadas tanto em linhagens selvagens como mutantes. A caracterização das linhagens quanto a presença de genes MAT foi realizada por meio de PCRs utilizando-se os primers, SKCM1-1 e 1-2 (MAT1), NcHMG1 e 2 (MAT2) e HGMgram 1 e 2 (MAT2). Os genes de *mating type* foram amplificados demonstrando que ambos os idiomorfos estão presentes nesta espécie. Algumas linhagens não amplificaram para nenhum dos idiomorfos, indicando que talvez essas linhagens não possuam o gene MAT ou este não codifica uma proteína com uma região *alpha box* ou *HMG box*. Todas as linhagens estudadas foram auto-estéreis. Não foi possível correlacionar o fenótipo mutante para auxotrofia, com as características morfológicas avaliadas.

**Palavras-Chave:** dimorfismo conidial, estruturas de resistência, ciclo sexual.

## 1. Introdução

A cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) está entre as cinco culturas de grãos mais importantes do mundo (Waquil *et al.*, 2003). Pela amplitude de condições ambientais em que é cultivado, o sorgo está sujeito ao ataque de um grande número de patógenos, alguns dos quais podem ser limitantes à qualidade e quantidade da produção (Casela *et al.*, 1997). Uma das mais importantes doenças na cultura é a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* P. Henn., Kabat & Bulbak. A doença encontra-se, atualmente, disseminada pelas principais regiões produtoras de sorgo do país, constituindo-se num fator limitante ao desenvolvimento da cultura, por ocasionar perdas severas na produção de grãos e de forragens (Guimarães *et al.*, 1999). Perdas superiores a 50%, na produção de grãos, têm sido relatadas, sob condições de epidemias severas, principalmente quando há alternância de condições secas e úmidas associadas a temperaturas elevadas (Casela *et al.*, 1997).

Na natureza, sua ocorrência se dá na forma mitospórica, podendo sobreviver como micélio, conídios e esclerócios em restos de cultura e em sementes infectadas. Esclerócios presentes em restos culturais a campo têm um importante papel como fonte de inóculo (Casela & Frederiksen, 1993), no entanto, estas estruturas nunca foram relatadas em cultivo artificial.

*Colletotrichum sublineolum* é uma espécie que apresenta alta variabilidade e especialização patogênica. Essas características foram observadas a partir de estudos que demonstram a existência de raças fisiológicas desse patógeno (Casela & Ferreira, 1987). Essa elevada variabilidade e especialização patogênica são os principais problemas enfrentados por fitopatologistas e melhoristas na busca de

materiais genéticos de sorgo resistentes à antracnose, pois, freqüentemente ocorrem quebras de resistência por este fungo (Casela & Ferreira, 1995).

Os mecanismos de transferência de material genético usados por *C.sublineolum* ainda são pouco conhecidos. Apesar deste agente ser facilmente cultivado em uma variedade de condições, vantagem que faz dele um organismo adequado para estudos fisiológicos e bioquímicos, poucas análises genéticas têm sido relatadas nesta espécie (Souza-Paccola *et al.*, 2003 b). Presumivelmente isto se deva ao fato de que o seu estágio sexual é raro e não foi observado na natureza (Vaillancourt & Hanau, 1991).

A ampliação da variabilidade genética para a grande maioria dos seres vivos ocorre através da reprodução sexual (forma meiospórica no caso de fungos), entretanto em muitas espécies de fungos este tipo de reprodução ainda não foi descrito; nesses casos, descrições mais detalhadas da forma assexual são necessárias (Roca *et al.*, 2003). *C. sublineolum* infecta plantas de sorgo por meio de propágulos assexuais, como conídios, hifas ou esclerócios. O papel dos esporos sexuais é incerto uma vez que corpos de frutificação sexual não têm sido observados no campo. Em muitos fungos a reprodução sexual é controlada por genes *mating-types* (genes MAT) com dois idiomorfos denominados *MAT1* e *MAT2* (Coppin *et al.*, 1997; Turgeon, 1998). A presença de genes de *mating-type* pode determinar se uma população está se reproduzindo sexualmente, uma vez que os genes *MAT* são necessários no processo de reprodução sexual (Turgeon, 1998).

Um outro processo de transferência de material genético em *C. sublineolum* é o ciclo parassexual (Souza –Paccola *et al.*, 2003a). Este ciclo foi descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* por Pontecorvo *et al.* (1953), e desde então foi

identificado em muitos Ascomicetos, Deuteromicetos e em heterocários de Basidiomicetos. No entanto, em um grande número de espécies, este processo apresenta um padrão distinto daquele descrito originalmente. O *C. sublineolum* enquadra-se neste caso, onde a fase diplóide do processo é transiente e não pode ser isolada, de forma que os recombinantes são obtidos diretamente do heterocário (Souza-Paccola *et al.*, 2003a). Este processo tem sido denominado de parameiose (Bonatelli Jr *et al.*, 1983) e já foi relatado em muitas espécies de fungos como *Acremonium chrysogenum* (Ball & Hamlyn, 1978), *Cephalosporium acremonium* (Ball & Hamlyn, 1982), *Aspergillus niger* (Bonatelli Jr *et al.*, 1983) *Metarhizium anisopliae* (Bagagli *et al.*, 1991), *Cladosporum fulvum* (Arnau & Oliver, 1993), *Trichoderma pseudokoningii* (Nadalini, 1997), *Beauveria bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991; Bello & Paccola-Meirelles, 1998) entre outras.

A alta instabilidade e variabilidade patogênica de *C. sublineolum* tem levado, muitas vezes, a uma redução na durabilidade e na estabilidade da resistência genética em cultivares de sorgo, a principal estratégia para o controle da antracnose (Ali & Warren, 1987; Bressan & Figueiredo, 2003).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar linhagens de *C. sublineolum* através da morfologia, conidiação e produção de estruturas de resistência e avaliar os mecanismos que envolvem a regulação do ciclo sexual e detectar a presença de genes para *mating-type* na espécie

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Linhagens de *Colletotrichum sublineolum***

Foram utilizadas linhagens selvagens de *C. sublineolum* obtidas da coleção de cultura do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo – Embrapa Sete

Lagoas/MG-Brasil. As linhagens mutantes, para o gene da nitrato redutase, utilizadas foram as obtidas por Fávaro (2004), depositadas no banco de linhagens do Laboratório de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR-Brasil (Tabela 1)

As linhagens selvagens foram mantidas em meio Batata Dextrose Agar (BDA) e as linhagens mutantes em meio para manutenção de mutantes *nit* (Fávaro *et al.*, 2006). As linhagens foram incubadas à 25°C sob luz contínua por sete dias e mantidas neste mesmo meio em geladeira.

## **2.2. Crescimento vegetativo e produção de conídios falcados e ovais**

A avaliação do crescimento vegetativo e a produção de conídios falcados e ovais foram realizados seguindo a metodologia descrita por Souza-Paccola *et al.*(2003a), onde a avaliação do crescimento vegetativo e produção de conídios falcados foi realizada em meio Aveia agar (75g aveia, 15g ágar por litro de água destilada). A produção de conídios ovais foi avaliada cultivando-se as linhagens em meio Caldo Batata Dextrose (BD).

**Tabela 1.** Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho

<b>Linhagem</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Origem</b>
30C	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
85.02	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
204.01	Selvagem	Embrapa – Sete Lagoas
15A.109	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15A.124	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15A.162	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.04	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.11	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.15	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.20	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15B.23	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.12	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.12.1	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.22.2	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.17	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.41	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.67	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
30C.74	Mutante Nit M	Fávaro (2004)
15E.11	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
15E.15	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.12	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.122	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)
30C.151	Mutante <i>nit1</i>	Fávaro (2004)

**Legenda:** *nit1*=mutação no locus estrutural da nitrato redutase. **NitM**= mutação em um dos *loci* responsáveis pela produção de um co-fator contendo molibdênio, necessário para a atividade das enzimas nitrato redutase e purina desidrogenase.

### 2.3. Produção, germinação e viabilidade de esclerócios

Para a avaliação da produção de esclerócios, linhagens de *C. sublineolum* foram inoculadas em meio agar-água (15g/L) acrescido de folhas de sorgo, com o acréscimo de solução de biotina (5µL/mL) e incubadas a 25°C sob luz contínua por 15 à 20 dias. As folhas de sorgo foram obtidas em casa de vegetação com 30 dias de crescimento, então foram lavadas com água e sabão neutro, cortadas em pedaços de 2-3cm<sup>2</sup> e autoclavadas emergidas em água destilada. Para avaliação qualitativa da produção foi estipulada uma nota de 0 à 3 onde, 0, nenhuma produção; 1, baixa produção; 2 média produção; e 3 alta produção de esclerócios. Também foi observada a produção de acérvulos, setas e conídios falcados, assim como a morfologia do micélio.

Para a verificação do tempo de germinação, esclerócios foram inoculados em lâminas de vidro contendo uma fina camada de BDA e observados por 2 dias à cada 6h. O mesmo teste foi realizado em placas de petri contendo meio BDA onde foram colocados folhas de celofane autoclavadas (2-3cm<sup>2</sup>). A cada 6h de incubação uma folha de celofane contendo um esclerócio germinado, foi retirada da placa colocada em lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico.

Para os testes de viabilidade germinativa após exposição a diferentes temperaturas os esclerócios obtidos foram mantidos nas temperaturas de -18°C, 4°C, 25°C e 37°C e após 5, 10, 15 e 20 dias foram retirados e inoculados em meio BDA. Também foram testados em relação a fatores influenciadores da germinação tais como temperaturas, aeração e presença de luz. Para isso, 50 esclerócios foram inoculados em placa de petri contendo meio BDA e incubados em diferentes condições.

## 2.4. Testes de compatibilidade sexual

Para a realização de testes de compatibilidade sexual linhagens selvagens e mutantes *nit* de *C. sublineolum* foram pareadas entre si, respeitando as reações de compatibilidade vegetativa (Fávaro, 2004) assim como as reações de compatibilidade sexual resultantes das análises de PCRs para o gene de *mating-type*. Os cruzamentos foram realizados em diferentes meios de cultura, temperatura e metodologia de inóculo, conforme descrito abaixo.

## 2.5. Extração de Ácidos nucleicos

As linhagens foram crescidas em BD, por 7 dias sob agitação (90rpm) a 25°C. O micélio foi filtrado, lavado com água destilada esterelizada, pesado, macerado (em nitrogênio líquido) e transferido para um tubo, onde para cada 0,5g de micélio foram adicionados 800µL de Tampão de extração (100mM TRis-HCl (pH8,0), 25mM EDTA, 1% SDS, 25mM NaCl). Este foi incubado por 20 minutos em banho-maria a 65°C. Após o período de incubação, foram adicionados 800µL de fenol, as fases foram misturadas e o tubo foi centrifugado a 12.000rpm por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a esta foi acrescentado igual volume de clorofane (1 clorofórmio:1 fenol). Centrifugou-se o tubo por 15 minutos a 12.000rpm e à fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofil (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) e centrifugado. O DNA foi precipitado transferindo-se a fase aquosa para um tubo contendo 2 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de NaCl 3M. Este foi incubado por uma hora à -18°C, após esse período foi centrifugado por 5 minutos a 12.000rpm. Ao precipitado foram adicionados 300µL de etanol 70% e repetiu-se a centrifugação anterior. Descartou-se o sobrenadante e após a secagem do DNA à temperatura ambiente este foi ressuscitado em 100µL de H<sub>2</sub>O destilada.

O DNA extraído foi quantificado e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 0,7%. O DNA extraído foi mantido a 4°C.

## 2.6. Reações em Cadeia de Polimerase (PCR)

Todas as reações foram preparadas segundo descrito em Arie *et al.* (1997) com algumas modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 20ng de DNA; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25mM de dNTP; 2,0mM de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil); 10mM de Tampão Tris-HCl pH8,3 e 50mM de KCl. As reações para o par de primers NcHMG (5' CC(CT)CG(CT)CC(CT)CC(CT)AA(CT)GCTA(CT)AT 3' e 5' CGGG(AG)TT(AG)TA(AG)CG(AG)TA(AG)T(AG)GG 3', respectivamente) (Arie *et al.* 1997) foram realizadas com temperatura de annealing em 50°C por 1 min. Para as amplificações do conjunto de primers SkCM1 (5' GCAGATCTCCGCACTGGAGC 3' e 5' GCAGATCTGTCGTCGATGGT 3', respectivamente) (Wirsel *et al.*, 1996) as condições de annealing foram de: 60°C por 1 min. Para o par de primers HMGgram (5' CGTATATTCTCTACCGCAAGG 3' e 5' GGGGGTGCAGTTTGTATG 3', respectivamente) (Du *et al.*, 2005) as amplificações foram realizadas com temperatura de annealing em 55°C por 50 segundos. Todas as reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.).

Para a análise dos produtos das PCRs, 15µL de cada reação foram submetidas a eletroforese em gel de agarose à 1,3%.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Características culturais: Crescimento vegetativo e produção de conídios falcados e ovais

Foram observados 6 tipos morfológicos de colônias, com a coloração variando de branco a rosa e cinza-escuro a cinza-claro. As linhagens 15B.04, 15B.15 e 30C.41 liberaram setores durante o crescimento vegetativo, confirmando a alta instabilidade genética deste patógeno, como já registrado por Fávaro *et al* (2007). As linhagens apresentaram variações entre si na taxa de crescimento micelial, sendo que a linhagem 15B.04 teve um maior crescimento atingido a margem da placa ao final de 8 dias, enquanto que, a linhagem 30C.151 a foi a de crescimento mais lento (Tabela 2).

Os conídios falcados, observados ao microscópio óptico, apresentaram-se hialinos e unicelulares, mesmo nas linhagens mutantes, demonstrando que a mutação não alterou a morfologia dessas estruturas assexuadas. Alterações morfológicas também não foram observadas nos conídios ovais que pudessem ser atribuídas às mutações nas linhagens (Figura 01). Estes apresentaram-se hialinos e multicelulares, semelhantes aos descritos por Souza-Paccola *et al.* (2003b). Variações na morfologia e tamanho foram registradas entre os isolados (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características culturais de *C. sublineolum* : crescimento vegetativo e produção de conídios falcados e ovais

Linhagem	Característica morfológica: cor da colônia	Crescimento radial (3 repetições)	Produção de conídios (n x10 <sup>4</sup> )		Tamanho médio de conídios ovais
			Falcados	Ovais	
<b>Selvagens</b>					
204.01	Cinza esverdeado	6,96 a	1908,3 a	17,16 de	14 x 5 µm c
85.02	Cinza claro	6,73 a	16,91 d	23,25 cde	17 x 4 µm b
<b>Mutantes Nit M</b>					
15A.109	Cinza médio	7,1 a	0,091 e	3 e	13 x 4 µm d
15B.04	Branco	7,98 a	Sem produção	36,58 cde	13 x 4 µm d
15B.15	Cinza esverdeado	7,58 a	0,25 e	24,58 cde	17 x 5 µm b
15B.23	Cinza esverdeado	6,9 a	62,66 c	44 cd	17 x 5 µm b
15E.12.1	Cinza médio	5,58 e	3 de	50,5 cd	14 x 3 µm cd
15E.22.2	Cinza esverdeado	5,0 f	Sem produção	60,41 bc	15 x 3 µm c
30C.17	Cinza esverdeado	6,83 a	93,41 c	9,08 e	13 x 4 µm d
30C.41	Cinza claro	6,41 bc	0,33 e	Sem produção	
30C.67	Cinza esverdeado	4,71 fg	5,58 de	Sem produção	
30C.74	Cinza esverdeado	6,11 de	021 e	2,91 e	15 x 4 µm c
<b>Mutantes nit1</b>					
15E.11	Cinza escuro	6,63 ab	385,41 b	9,33 e	18 x 4 µm ab
15E.15	Cinza claro	5,58 e	Sem produção	116,08 ab	17 x 3 µm b
30C.151	Rosa	4,38 g	0,08 e	167 a	9 x 2 µm e

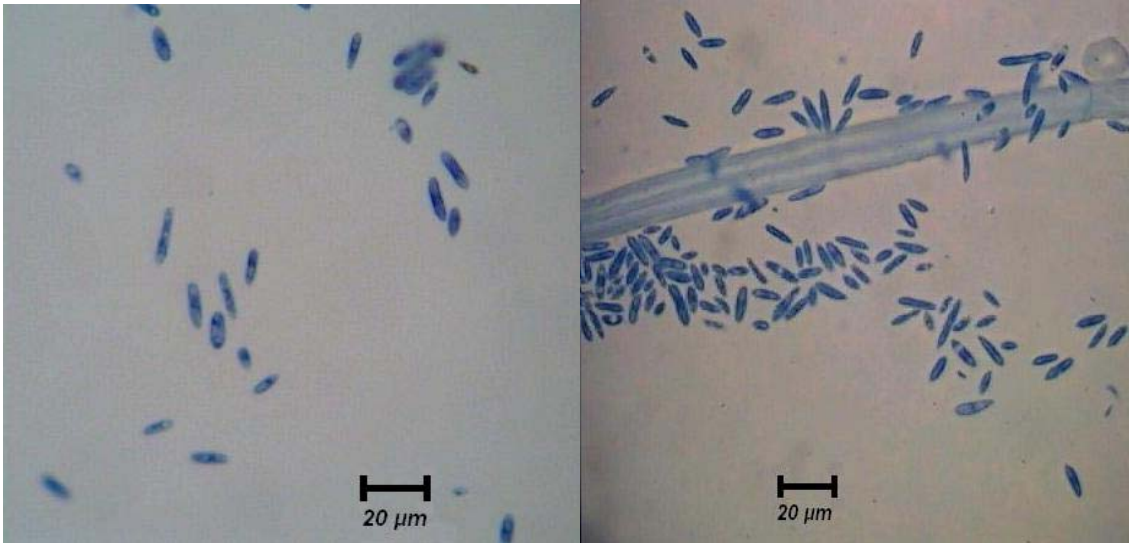
**Legenda:** *nit 1*=mutação no locus estrutural da nitrato redutase. **Nit M**= mutação em um dos *loci* responsáveis pela produção de um co-fator contendo molibdênio, necessário para a atividade das enzimas nitrato redutase e purina desidrogenase. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Todos os isolados produziram um ou outro tipo de conídio, embora observou-se uma grande variação entre as linhagens quanto a produção de conídios falcados, de 0 a  $19,08 \times 10^6$ . A linhagem 15E.11 foi a que se destacou na produção de conídios falcados entre as linhagens mutantes. As linhagens 15B.04, 15E.15 e 15E.22.2 não produziram conídios falcados. Normalmente este tipo de conídio é produzido somente após choque mecânico no micélio, no entanto as linhagens 15B.23 e a 15E.11 foram as únicas, entre as mutantes avaliadas, a produzir espontaneamente conídios falcados sem a necessidade de choque mecânico.

Uma alta variabilidade fenotípica pode ser observada na produção de conídios ovais, variando de 0 a  $16,7 \times 10^5$  conídios/mL, tendo a linhagem 30C.151 uma produção abundante de conídios. As linhagens 30C.41 e 30C.67 não produziram conídios ovais. A linhagem 15E.11 apresentou conídio de maior tamanho enquanto que a linhagem 30C.151 *Nit* 1 foi a que apresentou o menor tamanho de conídio (Tabela 2).

Comparando a produção dos dois tipos de conídios em cada linhagem, verifica-se que as linhagens 15E.22.2, 15E.15 e 15B.04 não produziram conídios falcados porém tiveram uma alta produção de conídios ovais. A linhagem 30C.151 de baixo crescimento radial, produziu poucos conídios falcados, mas teve uma alta produção de conídios ovais de pequeno tamanho. A linhagem 30C.67, também de baixo crescimento radial, teve uma produção de conídios falcados mediana e não produziu esporos ovais.

De forma geral podemos afirmar que as linhagens apresentaram uma alta variabilidade cultural, porém todas produziram pelo menos um dos dois tipos de conídios encontrados na espécie, o que permite utiliza-las em estudos em que este tipo de estrutura assexuada é necessária, como por exemplo em estudos genéticos.



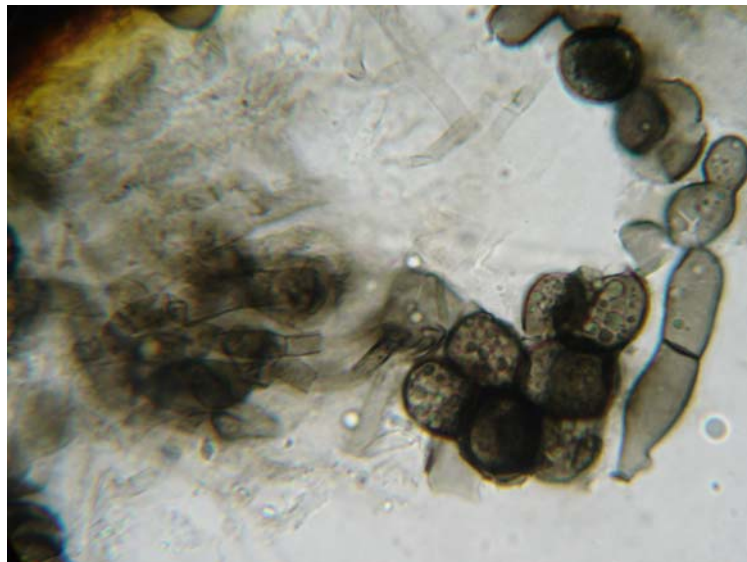
**Figura 01.** Conídios ovais obtidos de linhagens mutantes de *C. sublineolum*. Aumento de 400x.

### 3.2. Produção, germinação e viabilidade de esclerócios.

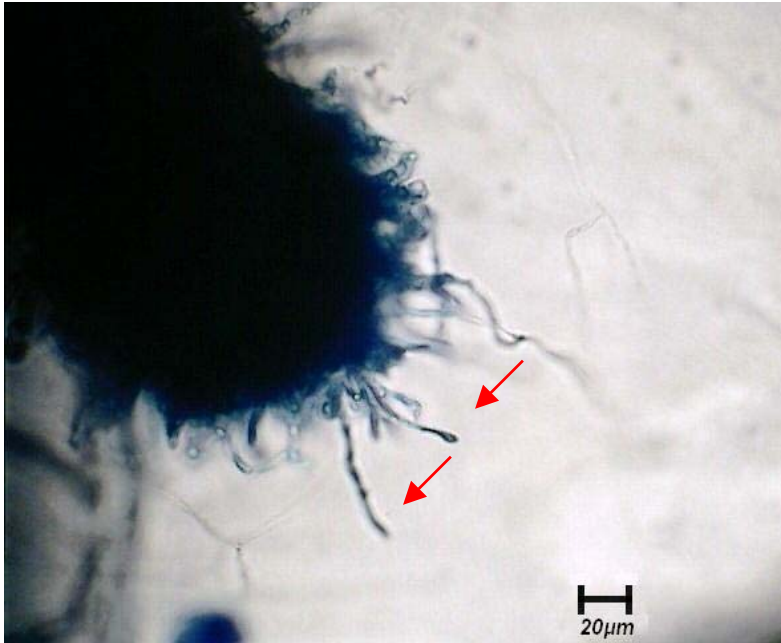
No presente trabalho algumas linhagens quando inoculadas em meio de cultura contendo folhas de sorgo esterilizadas, produziram esclerócios arredondados de coloração escura (Figura 02). Casela & Frederiksen (1993) já haviam relatado a presença de esclerócios em folhas de sorgo a campo, e observaram a sobrevivência destes no solo por até 18 meses. Estas estruturas, segundo estes autores, poderiam representar a fonte inicial de infecção da antracnose no campo. Este é o primeiro relato da produção destas estruturas em laboratório, em *C. sublineolum*, muito embora, como descrito abaixo, a produção de esclerócios variou dependendo da linhagem utilizada.

Esclerócio é uma estrutura de resistência capaz de sobreviver às mais diversas alterações de temperaturas e à condições desfavoráveis. Apresenta morfologia arredondada com diâmetro variável de 1mm a 1cm dependendo da espécie fúngica. Quando germinado, pode dar origem a hifas vegetativas ou a estruturas reprodutivas sexuais. Composto por micélio o qual sofre modificações

para formar células e estruturas distintas (Moore-Landecker, 1982). A habilidade de algumas espécies em formar essas estruturas é também utilizada como uma das ferramentas da taxonomia (Latune-Dada, 2001). A produção é iniciada por falta de nutrientes ou por outras condições desfavoráveis ao desenvolvimento e crescimento normal das hifas. Estas estruturas permitem um aumento da sobrevivência do fitopatógeno no solo na ausência de plantas hospedeiras (Carlile & Watkinson, 1997).



**Figura 02.** Esclerócios obtidos a partir da linhagem 15B.04 de *C. sublineolum*. Aumento de 400x.



**Figura 03.** Germinação (setas) de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* após 6 horas da inoculação em meia Batata Dextrose Ágar. Aumento de 40X.

Dillard (1988) avaliou fatores que poderiam influenciar a germinação e crescimento dos esclerócios de *C. coccodes in vitro* (temperatura, pH, potencial osmótico e sensibilidade a fungicidas) e demonstrou que existem diferenças significativas entre esses fatores que podem levar a uma germinação e desenvolvimento diferenciados. Já Sanogo & Pennypacker (1997) realizaram estudos citológicos de germinação e desenvolvimento em esclerócios de *C. coccodes* obtidos em cultivo de laboratório em meio BDA. Os autores observaram diferenças no desenvolvimento dos esclerócios após germinação na presença e na ausência de luz, com placas vedadas ou não. Quando o cultivo ocorreu em placas não vedadas houve a formação de setas e produção de conídios, mas quando o cultivo foi em placas vedadas apenas ocorreu crescimento micelial. Já na ausência de luz tanto em placas vedadas como não vedadas houve a produção de algumas setas e conídios, mas nas placas vedadas não houve a formação de micélio.

Concluíram assim que a germinação e o desenvolvimento de esclerócios de *C. coccodes* é mais sensível a variação de luz e aeração do que a de temperatura.

No meio utilizado, água-ágar acrescido de segmentos foliares, nem todas as linhagens produziram esclerócios (Tabela 3), demonstrando também variabilidade para este caráter.

Foram também observadas variações no processo de conidiogênese dos conídios falcados. Em condições normais, a uma temperatura próxima de 25 °C, culturas desenvolvidas em meio artificial, produzem grande quantidade de conídios falcados em resposta a um choque mecânico e à luz contínua. Acérvulos são estruturas de frutificação assexuada do patógeno. Apresentam coloração marrom escura, formato circular ou oval, medem de 70-300 µm e são caracterizados pela presença de setas negras e pela grande quantidade de conídios falcados produzidos em uma massa de coloração rosa a creme tanto em meio de cultura como em tecido do hospedeiro. Os conidióforos são curtos, eretos, hialinos, não septados e não ramificados, medindo de 1,6–3,3 x 4,9–13,3 µm. As setas são longas e septadas, com comprimento de cerca de 100 µm e são formadas entre os conidióforos (Casela & Ferreira, 1998). Os conídios falcados são produzidos isoladamente na extremidade dos conidióforos entre as setas e em massas imersas em um substrato gelatinoso.

Nas linhagens selvagens 30C e 85.02, e nos mutantes 15B.20 , 15B.23 e 15E.12 detectou-se ausência de setas nos acérvulos e em outras como, 204.01, 30C.17, 30C.122 e 15E.15 houve formação de conídios falcados diretamente do micélio, sem a formação aparente de acérvulos (Tabela 3), o que não é comum na espécie.

A avaliação da viabilidade germinativa dos esclerócios mostrou uniformidade entre as linhagens analisadas quanto a este caráter. Esclerócios mantidos à -18°C não germinaram, e de forma semelhante não resistiram a temperatura de 37°C quando mantidos nestas condições em período superior a 10 dias.

Quanto ao tempo de germinação dos esclerócios pode-se observar que a germinação dos esclerócios começa a partir de 6h após inoculação direta em meio de cultivo (Figura 03). Em inoculação indireta, ou seja sobre membranas de celofane depositadas em meio BDA, a germinação teve início a partir de 12h da inoculação.

Muitos estudos citológicos e fitopatológicos (Georgiou, 1997; Georgiou *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2005; Wicklow & Shotwell, 1982; Wicklow *et al.*, 1993; Willets, 1997) têm sido realizados com esclerócios de fungos fitopatogênicos por seu caráter como estruturas de resistência. Farley (1976) estudando a sobrevivência de esclerócios de *C. coccodes*, agente causal da antracnose em tomate, no solo concluiu que esclerócios remanescentes do cultivo anterior eram a primeira forma de infecção em novos cultivos de tomate. A sobrevivência destas estruturas no solo foi de um a dois anos. Já Normam & Strandberg (1997) relataram uma sobrevivência de até 6 meses, em condições de laboratório, de esclerócios de *C. acutatum*, agente causal da antracnose em samambaias. Em *Aspergillus flavus*, (Wicklow *et al.*, 1993) a sobrevivência dos esclerócios no solo pode chegar a 3 anos.

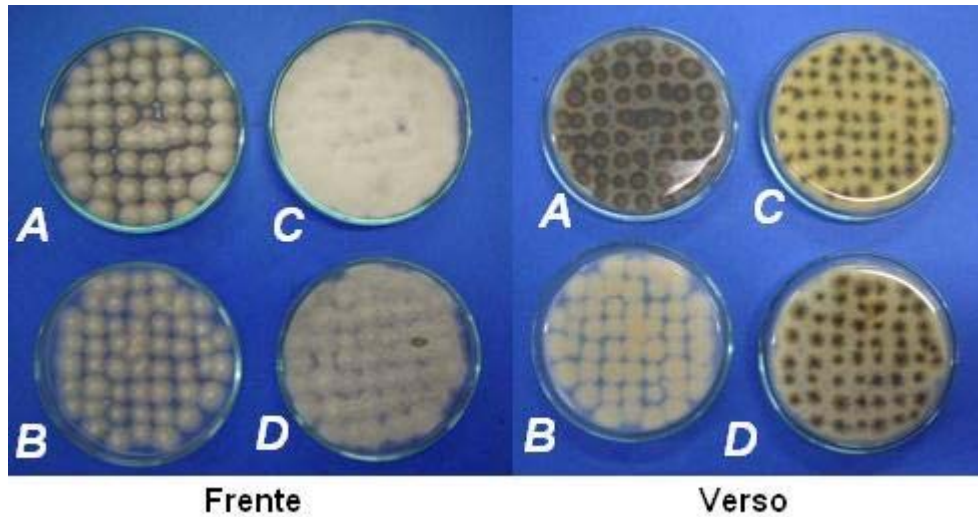
**Tabela 3.** Caracterização morfológica de linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* quanto á produção de esclerócios e estruturas reprodutivas assexuais em meio àgar-água acrescido de folhas de sorgo.

Linhagem	Micélio	Produção			
		Esclerócios	Acérvulo	Setas	Conídios Falcados
<b>Selvagem</b>					
204.01	MP	2	-	-	+
30C	MP	1	+	-	+
85.02	MP	2	+	-	+
<b>Mutante Nit M</b>					
15A.109	MP	3	-	-	-
15A.124	MP	0	+	+	+
15A.162	MP	0	+	-	+
15B.04	MP	2	-	-	-
15B.11	MF	1	-	-	-
15B.20	MP	2	+	-	+
15B.23	MF	2	+	-	+
15E.12	MP	0	+	-	+
15E.22.2	MP	1	-	-	-
30C.17	MP	1	-	-	+
30C.41	MP	0	-	-	-
30C.67	MP	0	-	-	-
<b>Mutante nit1</b>					
15E.15	MF	2	-	-	+
30C.12	MF	3	+	+	+
30C.122	MF	0	-	-	+

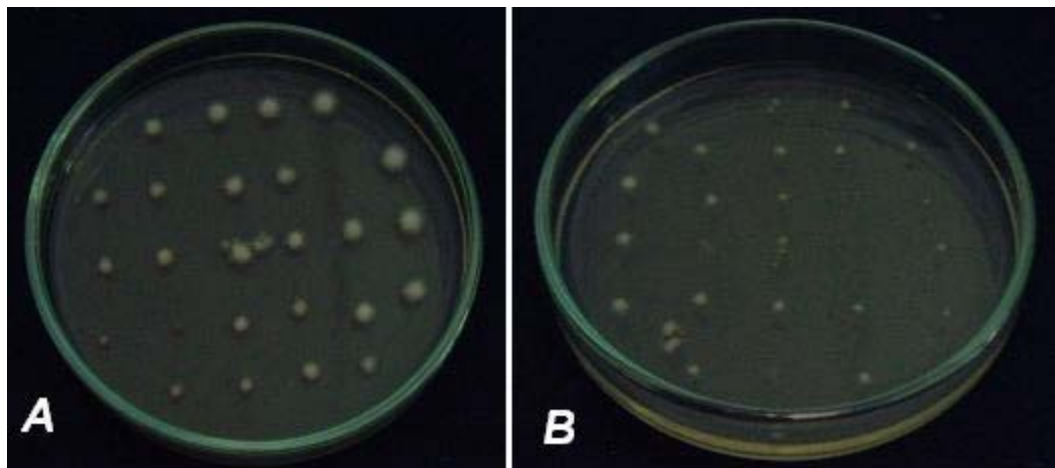
**Legenda:** *nit 1*=mutação no locus estrutural da nitrato redutase. **Nit M**= mutação em um dos loci responsáveis pela produção de um cofator contendo molibdênio, necessário para a atividade das enzimas nitrato redutase e purina desidrogenase. **MP**= Micélio aéreo, vigoroso, cinza claro; **MF**= micélio fraco, sem vigor, branco.; **(-)** = Não houve formação da estrutura; **(+)** = Houve a formação da estrutura. **Notas= 0**-sem produção; **1**-baixa produção (abaixo de 5 esclerócios por cm<sup>2</sup>de folha); **2**-média produção (variando de 5 a 25\_ esclerócios por cm<sup>2</sup>de folha); **3**-alta produção de esclerócios (acima de 25 esclerócios por cm<sup>2</sup> de folha).

A germinação dos esclerócios foi influenciada pela aeração e presença de luz (Figura 04). Os resultados mostram que em presença de luz a germinação e o crescimento do micélio tornam-se mais lento comparado com a germinação na ausência de luz. Micélio resultante da germinação do esclerócio mostra alterações na coloração quando cultivado em presença ou ausência de luz. Em presença de luz o micélio adquire a coloração salmão-marrom, e na ausência a coloração branco-amarelado.

Em relação à temperatura, quando os esclerócios foram incubados a 37°C sua germinação foi lenta, desenvolvendo um micélio fino e sem vigor (Figura 05). Em condições de baixa oxigenação ocorreu a germinação, porém o crescimento foi mais lento do que em relação ao crescimento nas placas sem vedação. Em nenhum dos testes a germinação dos esclerócios e subsequente desenvolvimento micelial resultou na formação de acérvulos, setas e conídios falcados.



**Figura 04.** Germinação e crescimento de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* em meio BDA, por 7 dias à 25°C. *A* - presença de luz com aeração. *B* - presença de luz sem aeração. *C* - ausência de luz com aeração e *D* - ausência de luz sem aeração.



**Figura 05.** Germinação e crescimento de esclerócios da linhagem 85.02 de *C. sublineolum* em meio BDA, por 7 dias à 37°C. *A* - ausência de luz com aeração e *B* - ausência de luz sem aeração.

### 3.3. Testes de compatibilidade sexual

A reprodução sexual baseia-se na procriação de novos indivíduos e para que ela ocorra com sucesso são necessários vários elementos – compatibilidade vegetativa, formação de estruturas sexuais, plasmogamia e cariogamia – que são controlados por fatores genéticos, hormonais, nutricionais e ambientais (Moore-Landecker, 1982).

Os testes realizados não foram suficientes para a identificação de qual(s) fator ambiental e/ou nutricional estaria envolvido na indução do ciclo sexual em *C. sublineolum*. Em todas as metodologias empregadas houve a formação de heterocário, mas não houve a formação de corpo de frutificação sexual.

### 3.4. Identificação de genes para “*mating-type*” em *C. sublineolum*

Em ascomicetos heterotalicos complementação entre MAT1 e MAT2 é necessária para a reprodução sexual. Entretanto genes MAT1 e MAT2 também tem sido encontrados em ascomicetos homotáticos sugerindo que genes MAT podem ter um papel na regulação sexual mesmo em fungos que se autocruzam. (Coppin *et al.*, 1997)

A primeira caracterização molecular do *loci* para *mating-type* foi realizada para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por Astell *et al.*, (1981). Genes para *mating-type* têm sido clonados de diferentes tipos de fungos, incluindo leveduras, ascomicetos (Christiansen, *et al.*, 1998; Glass, *et al.*, 1988; Picard, *et al.*, 1991) e basidiomicetos (Giasson, *et al.*, 1989). Apesar de que nenhuma similaridade da seqüência de DNA importante tenha sido encontrada entre os genes *MAT* desses fungos, foram observadas similaridades entre os aminoácidos em regiões altamente conservadas. Análises moleculares das seqüências de nucleotídeos dos genes *MAT*

mostram que todos eles codificam reguladores transcricionais; regiões de *DNA-binding* foram encontradas nas proteínas codificadas por cada gene MAT. Um dos tipos de proteína *DNA-binding* tem uma região *high mobility group* (HMG) encontrada em membros das proteínas HMG (Figura 06). O outro idiomorfo MAT codifica uma proteína que possui uma região chamada *alpha box* (Turgeon, 1998). Arie *et al.* (1997) desenvolveram primers degenerados usando essas regiões como modelo, e conseguiram amplificar essas regiões em vários loculoascomicetos (*Cochliobolus ssp.*, *Setosphaeria rostrata*, *Pyrenophora teres*) e pyrenomicetos (*Neurospora crassa*, *Nectria haematococca*). Esses produtos de PCR podem ser utilizados como pontos iniciais para a clonagem dos genes de *mating-type* de vários Ascomicetos. Com base nesses estudos os primers SkCM 1-1 e SkCM1-2 (para MAT1) e NcHMG1 e NcHMG2 (para MAT2) e os primers específicos para *C. graminicola* e *C. sublineolum* HMGgram 1e HMGgram2 (MAT2) foram utilizados para realizar reações de PCR com o objetivo de identificar a presença dos genes idiomorfos para *mating-type* e caracterizar as linhagens de *C. sublineolum* quanto ao seu *mating-type*. A nomenclatura utilizada neste trabalho seguiu a proposta por Turgeon & Yoder (2000), onde MAT1 se refere ao gene MAT que possua a região conservada *alpha box* e MAT2 ao gene MAT que possua a região HMG box.

Varga (2003) observou a presença de uma ORF (*open reading frame*) codificando um gene MAT em *Aspergillus fumigatus*. Isto foi altamente significativo porque esta espécie se reproduz somente por meios assexuais. Isto sugere que *A. fumigatus* possui um potencial latente para sexualidade como já descrito por Gow *et al.*, (2000) para o patógeno, supostamente assexuado, *Cândida albicans*, ou que *A. fumigatus* é derivado de um ancestral sexual (Hiscock, 1999; Kues, 2000;

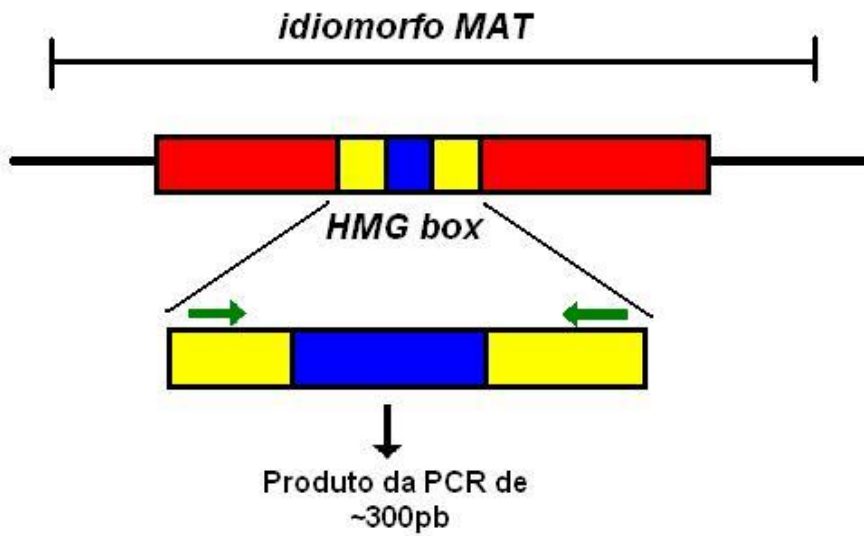
Casselton, 2002). E Covert *et al.* (1999) utilizaram o par de primers NcHMG com sucesso para amplificar e sequenciar o idiomorfo MAT2 em *Gibberella circinata*.

Quando os primers degenerados NcHMG foram utilizados, apenas 8 das linhagens testadas, dentre elas 3 selvagens e 5 mutantes amplificaram para gene MAT2. O fragmento obtido foi de ~400 pb (Figura 07), em concordância com os resultados obtidos por Arie *et al.* (1997). Porém quando os primers específicos HMGgram, construídos para *C. graminicola* (Du *et al.*, 2005) foram utilizados, 16 linhagens amplificaram para o gene MAT2 (Figura 08), com um fragmento de ~300pb. Indicando que a utilização de primers específicos para o gênero *Colletotrichum* se faz necessária para que se obtenha uma maior eficiência de amplificação.

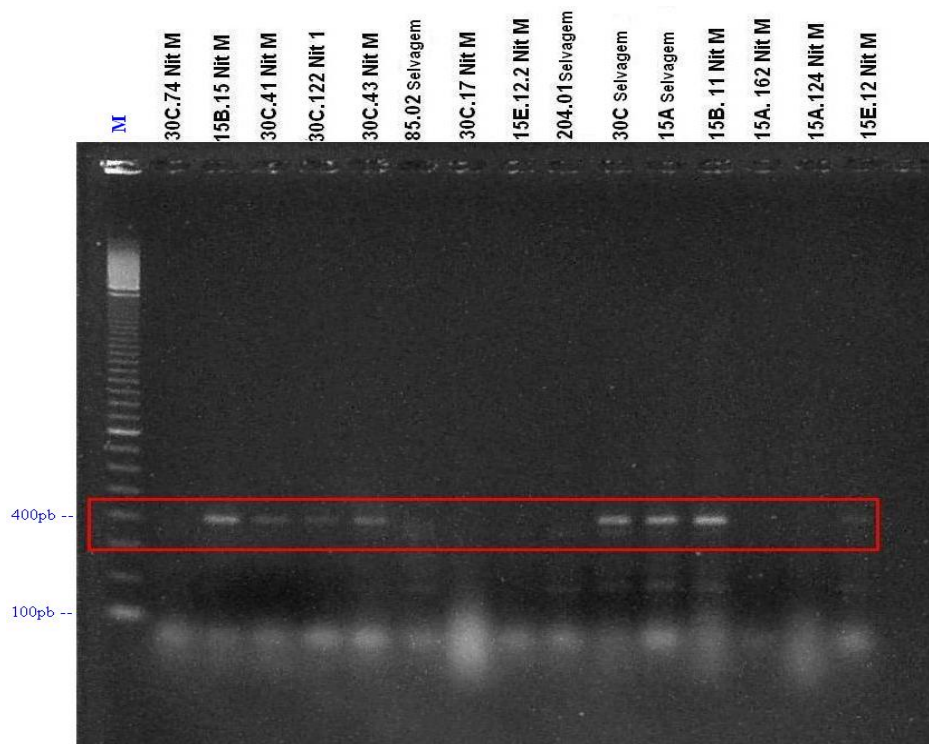
Apenas as linhagens 15A, 15B.04, 15E.12, 15E.22.2 e 30C.38 amplificaram para o par de primer SkCM (MAT1) (Figura 09). Amplificação nestas mesmas linhagens também foi verificada para o par de primers HMGgram, indicando que essas linhagens possuem os dois idiomorfos para o gene de *mating-type*, o MAT1 e o MAT2. No entanto ausência de amplificação para ambos os idiomorfos foi verificada nas linhagens 15A.109, 15A.124, 15B.46, 30C.05, 30C.12, 30C.17, 30C.67 , 30C.70. Isso poderia ser atribuído a duas hipóteses, a primeira seria de que essas linhagens não possuem o gene MAT, e, a segunda de que nessas linhagens, o gene MAT não codifica uma proteína com uma região *alpha box* ou *HMG box* como ocorre com a levedura *S. cerevisiae*, onde nenhum dos *mating-types* idiomorfos codifica para uma proteína HMG box (Nelson, 1996). Apenas uma linhagem, a 15B.11, amplificou para o primer NcHMG mas não para o primer HMGgram.

No ascomiceto *Glomerella graminicola*, teleomorfo do *C. graminicola*, o sistema de cruzamento é complexo. Foi verificada a ocorrência tanto de linhagens homotáticas quanto heterotáticas em uma mesma população (Vaillancourt *et al.*, 1999) e que linhagens homotáticas dão origem a uma progênie heterotática em alta frequência (Vaillancourt & Hanau, 1991). Em *Glomerella cingulata* foi descrita a ocorrência de um tipo diferente de heterotalismo, o heterotalismo desbalanceado (Wheeler, 1954), onde o cruzamento entre linhagens portadoras deste tipo de heterotalismo dão origem a linhagens segregantes homotáticas. Linhagens portadoras de heterotalismo verdadeiro originam somente linhagens heterotáticas.

Em *G. graminicola*, segundo estudos realizados por Vaillancourt *et al.* (2000), a fertilidade cruzada é geneticamente mais complexa, e funciona pelo menos em parte via heterotalismo desbalanceado e é regulada por dois *loci*, que não estão ligados. Entretanto um dos *locus* não é um típico *MAT* idiomorfo de ascomicetos, pois a região HMG box do idiomorfo *MAT2* de *G. graminicola* foi encontrado nos dois progenitores de um cruzamento. Vaillancourt *et al.* (2000) não conseguiram amplificar a seqüência *alpha box* do *MAT1*. Assim se *G. graminicola* possui um gene *MAT 1* semelhante aos demais ascomicetos, pode ser que este não contenha a seqüência *alpha box* bem conservada. Outra possibilidade é de que *G. graminicola* possua apenas o idiomorfo *MAT 2*.



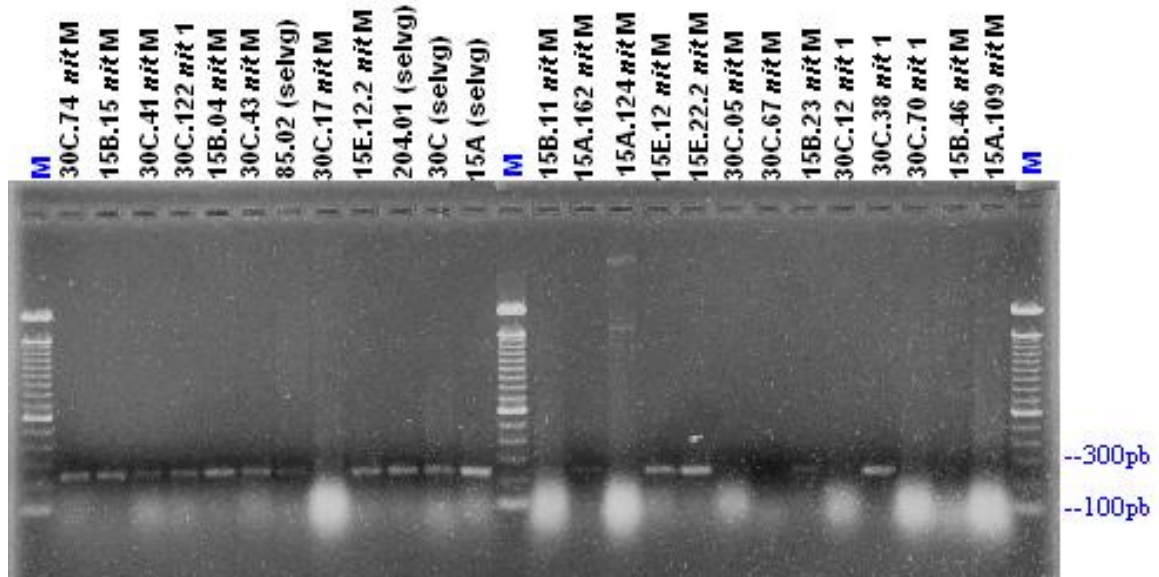
**Figura 06.** Esquema da estrutura do gene MAT e da amplificação da região conservada do gene. Em azul e amarelo a região conservada do gene, sendo a amarela a que é usada como molde para a confecção dos primers e em azul a região que é amplificada na PCR. As setas verdes representam a direção em que irá ocorrer amplificação iniciada pelos primers.



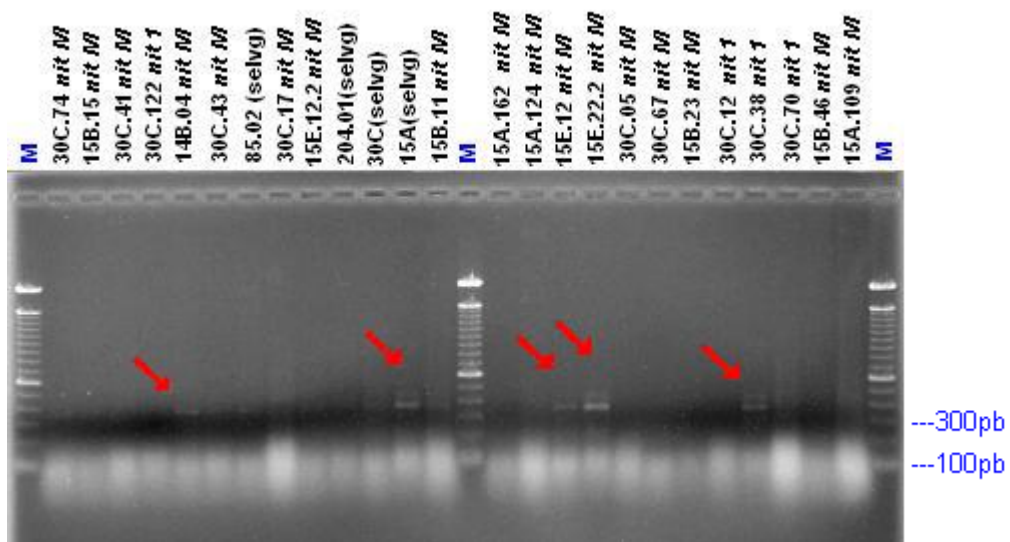
**Figura 07.** Produtos de PCR obtidos com o par de primers NcHMG (MAT2) em gel de agarose 1,4%.

Os resultados demonstram que *C. sublineolum* apresenta um complexo sistema mating-type.

Quando os genes para *mating-type* de várias espécies de *Cochliobolus sp* foram clonados e sequenciados por Yun *et al.* (1999) a análise molecular indicou que algumas espécies possuem arranjo estrutural diferenciados dos esperados. *C. luttrellii* e *C. homomorphus* possuem os dois genes (MAT1 e MAT2) presentes no mesmo cromossomo em ligação, um ao lado do outro. Em *C. cynbopogonis* os dois idiomorfos estão presentes, mas em cromossomos distintos e em *C. kusanoi* estes encontram-se no mesmo cromossomo, mas separados pelo gene da  $\beta$ -glucosidase. É possível também que, por processos de recombinação genética, essas espécies, antes heterotáticas estejam em evolução para o homotalismo. Esses resultados (Yun *et al.*, 1999; Vaillancourt *et al.*, 2000) poderiam explicar, em parte, os obtidos no presente trabalho, com *C. sublineolum*.



**Figura 08.** Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do primer HMGgram (MAT2) em gel de agarose 1,4%.



**Figura 09.** Produtos da amplificação a partir do par de primers SkCM (MAT1) em gel de agarose 1,4%.

#### 4. Referências

Ali, M.E.K., H.L. Warren (1987): Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. *Plant Disease* **71**, 402-404.

Arie, T., S.K. Christiansen, O.C. Yoder, B.G. Turgeon (1997): Efficient cloning of Ascomycetes mating type genes by PCR amplification of the conserved MAT HMG box. *Fungal Genetics and Biology* **21**, 118-130.

Arnau, J., R. P. Oliver (1993): Inheritance and alteration of transforming DNA during an induced parasexual cycle in the imperfect fungus *Cladosporium fulvum*. *Current Genetics* **23**, 508-511.

Bagali, E., M.C. Furlaneto, A. Pizzirani-Kleiner, J.L. Azevedo (1995): Genetic recombinants in *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai) without typical parasexuality. *Canadian Journal of Microbiology* **41**, 1132 - 1134.

Ball, C., P.F. Hamlyn (1982): Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic cephalosporin. *Revista Brasileira de Genética* **5**, 1-13.

Ball, C., P.F. Hamlyn (1978): The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Revista Brasileira de Genética* **1**, 83-96.

Bello, V.A., L.D. Paccola-Meirelles (1998): Localization of auxotrophic and benomyl resistance markers through the parasexual cycle in the *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill entomopathogen. *Journal of Invertebrate Pathology* **72**, 119 - 125.

Bonatelli, J.R.; J.L. Azevdo, G.U. Valent (1983): Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Genetics* **3**, 399 - 405.

Bressan, W., J.E.F. Figueiredo (2003): Controle biológico de raças e isolados de *Colletotrichum graminicola*, do sorgo, por Actinomicetos. Embrapa milho e Sorgo – Comunicado Técnico **62**.

Carlile, M. J., S. C. Watkinson (1997): *The Fungi*. Academic Press, 4<sup>a</sup> Ed. London.

Casela, C.R., A.S. Ferreira (1995): Virulence associations in the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Fitopatologia Brasileira* **20**, 33–38.

Casela, C.R., A.S. Ferreira (1987): Proposta de um sistema de classificação de raças de *Colletotrichum graminicola* agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). *Fitopatologia Brasileira* **12**, 337-344.

Casela, C.R., A.S. Ferreira (1998): Antracnose do Sorgo (*Colletotrichum graminicola*). Embrapa Milho e Sorgo - Circular Técnica **28**, 07-19.

Casela, C.R., Frederiksen, R.A. (1993): Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. *Plant Disease* **77**, 825-827.

Casela, C.R., M.F.J.A. Pinto, E. Oliveira, A.S. Ferreira (1997): Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.) Controle de doenças de plantas. Editora UFV, Viçosa-MG. 1025-1064.

Casselton, L. A. (2002). Mate recognition in fungi. *Heredity* **88**, 142 - 147.

Christiansen, S.K., S. Wirsal, S-H. Yun, O.C. Yoder, B.G. Turgeon (1998). The two *Cochliobulus* mating type genes are conserved among species but one of them is missing in *C. victoriae*. *Mycological Research* **102**, 919-929.

Coppin, E.; R. Debuchy, S. Arnaise, M.Picard (1997): Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiological Molecular and Biological Reviews*. **61**, 411–428.

Covert, S.F., A. Briley, M.M. Wallace, V.T. McKinney (1999): Partial MAT-1 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology* **28**, 43-54.

Dillard, H.R. (1988): Influence of temperature, pH, osmotic potential and fungicide sensitivity on germination of conidia and growth from sclerotia of *Colletotrichum coccodes* in vitro. *Phytopathology* **78**, 1357-1361.

Du, M., C.L. Schardl, E.M. Nuckles, L.J. Vaillancourt (2005): Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complex **97**, 641-658.

Farley J.D. (1976): Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil. *Phytopathology* **66**, 640-641.

Fávaro, L.C.L. (2004): Instabilidade genética em *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Fávaro, L.C.L., W.L. Araújo, E.A. Souza-Paccola, J.L. Azevedo, L.D. Paccola-Meirelles (2007): *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. *Mycological Research* **111**, 93-105.

Georgiou, C.D. (1997): Lipid peroxidation in *Sclerotium rolfsii*: a new look into the mechanism of sclerotial biogenesis in fungi. *Mycological Research* **101**, 460-464.

Georgiou, C.D., N. Tairis, A. Sotiropoulou (2000): Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in phytopathogenic fungi. *Mycologia* **92**, 825-834.

Giasson, L., C.A. Specht, C. Milgrim, C.P. Novotny, R.C. Ulrich (1989): Clonig and comparison of Aa mating-type alleles of Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Molecular General in Genetics* **218**, 72-77.

Glass, N.L., S.J. Vollmer, C. Staben, R.L. Metzenberg, C. Yanofsky (1988): DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* **241**, 570-573.

Gow, N.A.R., A. J.P. Brown, F.C. Odds (2000): *Candida's* Arranged Marriage, *Science* **289**, 256-257.

Guimaraes, F.B., C.R. Casela, F.G. Santos, J.C.R. Pereira, A.S. Ferreira (1999): Avaliação da resistência de genótipos de sorgo a antracnose. *Summa Phytopathologica* **25**, 308-312.

Harel, A., R. Gorovits, O. Yarden (2005): Changes in protein kinase a activity accompany sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **95**, 397-404.

Hiscock, S.J, U. KUES (1999): Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *International Reviews of Cytology* **193**, 165-295.

Kues, U. (2000): Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology Molecular and Biological Reviews* **64**, 316-53.

Latune-Dada, A.O. (2001): *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* **2**, 187-198.

Moore-Landecker, E. (1982): *Fundamentals of the fungi*. Prentice-Hall, Inc. 2<sup>a</sup> Ed, New Jersey.

Nadalini, M.F.C., A.A. Pizzirani-Kleiner, E.C Carmona (1999): Cellulolytic activity of wild and mutant *Trichoderma pseudokoningii*. *Journal of Basic Microbiology* **39**, 351-356.

Nelson, M.A. (1996): Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends in Genetics* **12**, 69-74.

Norman, D.J., J.O. Strandberg (1997): Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. *Plant Disease* **81**, 1177-1180.

Paccola-Meirelles, L.D., J.L. Azevedo (1991): Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**, 172-176.

Picard, M., R. Debuchy, Coppin E. (1991): Cloning the mating- types of the heterothallic fungus *Podospora anserina* – developmental features of haploid transformants carrying both mating types. *Genetics* **128**, 539-547.

Roca, M.M.G., J.C. Machado, M.G.G. Vieira, L.C. Davide, M.L.M. Rocha (2004): Sexual and vegetative compatibility of *Glomerella-Colletotrichum* complex associated with cotton seeds. *Fitopatologia Brasileira* **29**, 12-16.

Sanogo, S., S.P. Pennypacker (1997): Factors affecting sporogenic and myceliogenic germination of sclerotia of *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease* **81**, 333-336.

Souza-Paccola, E.A., L.C.L. Fávaro, C.A. Bomfeti, S.F.P. Mesquita, L.D. Paccola-Meirelles (2003a): Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Phytopathology* **151**, 383-388.

Souza-Paccola, E.A., L.C.L. Fávaro, C.R. Casela, L.D. Paccola-Meirelles (2003b): Genetic recombination in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Phytopathology* **151**, 329-334.

Turgeon, B.G., O.C. Yoder (2000): Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **31**, 1-5.

Turgeon, B.G. (1998): Application of mating type technology to problems in fungal biology. *Annual Reviews of Phytopathology* **36**, 115-137.

Vaillancourt, L.J., R.M. Hanau (1991): A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* from maize. *Phytopathology* **81**, 530-534.

Vaillancourt, L.J., M. Du, J. Wang, J. Rollins, R.M. Hanau (2000): Genetic analysis of cross fertility between two self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. *Mycologia* **92**, 430-435.

Varga, J. (2003): Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **149**, 816–819.

Waquil, J.M., P.A. Viana, I. Cruz (2003): Manejo de pragas na cultura do sorgo. *Embrapa milho e Sorgo – Circular Técnica* **27**, 65.

Wheeler, H. E. (1954): Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. *Phytopathology* **44**, 342-365.

Wicklow, D.T., O.L. Shotwell (1982): Intrafungal distribution of aflotoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Canadian Journal of Microbiology **29**, 1-5.

Wicklow, D.T., D.M. Wilson, T.C. Nelsen (1993): Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia. Phytopathology **83**, 1141-1147.

Willems, H.J. (1997): Morphology, development and evolution of stromata/sclerotia and macroconidia of the Sclerotiniaceae. Mycological Research **101**, 939-952.

Wirsel, F., B.G. Turgeon, O.C. Yoder (1996): Deletion of the *Cochliobolus heterostrophus* matyng-type (MAT) locus promotes the function of MAT transgenes. Currents Genetics **29**, 241-249.

Yun, S-H., M.L. Berdee, O.C. Yoder, B.G. Turgeon (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 5592-5597.

**ARTIGO II**

**ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE  
*COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM* \***

\*Este capítulo será enviado para o periódico científico Mycological Research

**ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE  
*COLLETOTRICHUM SUBLINEOLUM***

Zanette, G.F<sup>1</sup> ; Nóbrega G.M.A<sup>1</sup> ; Paccola-Meirelles, L.D<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL – Paraná, Brasil.

\*Correspondência: Tel.: +55-43-3371-4417; Fax: +55-43-3371-4527

E-mail: [paccola@uel.br](mailto:paccola@uel.br)

## RESUMO

Desde sua descoberta, os protoplastos tornaram-se ferramentas biológicas importantes para pesquisas em fungos filamentosos, tais como, genética clássica, transformação genética, cariotipagem molecular, entre outros. Neste trabalho estabeleceu-se condições de isolamento e regeneração de protoplastos de linhagens selvagens e mutantes para nitrato redutase (mutantes nit) de *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose no sorgo. Foram testadas duas enzimas líticas comerciais, Lysing enzyme (Sigma) e Glucanex (Novozymes) para a obtenção dos protoplastos a partir de micélio e de conídios ovais. Paralelamente, analisaram-se, tempos de digestão e frequência de regeneração. A protoplastização do micélio, foi realizada em cultura líquida utilizando o meio caldo batata em 18h de crescimento a 25 °C. Para cada mg de micélio foi adicionado 20 µL de solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6M pH 5,8 (estabilizador osmótico) acrescido da enzima na proporção de 5% do peso do micélio. Para o isolamento de protoplastos a partir de conídios ovais, a melhor produção foi obtida quando utilizado 100mg da enzima para cada 3mL do estabilizador osmótico. Ambas as enzimas digeriram a parede do micélio, porém maior produção de protoplastos foi obtida com a enzima Glucanex. O tempo de digestão variou entre as duas enzimas, sendo que protoplastos foram formados a partir de 3 horas de exposição com a Lysing enzyme e 2 horas para a enzima Glucanex. Com a enzima Lysing enzyme não foi possível o isolamento de protoplastos a partir de conídios, apenas de micélio. A maior frequência de regeneração obtida foi de 36,6% e 25% em protoplastos obtidos com 3 horas de tratamento com Lysing enzyme e 2 horas de tratamento com Glucanex, respectivamente. Este é o primeiro relato de produção de regeneração de protoplastos na espécie.

**Palavras – Chave:** *antracnose, micélio, conídios.*

## 1. INTRODUÇÃO

*Colletotrichum sublineolum* P. Henn é o agente causal da antracnose do sorgo, uma das doenças mais importantes da cultura no Brasil (Ferreira *et al.*, 1998). Este patógeno apresenta uma alta variabilidade e instabilidade genética e os mecanismos atualmente propostos para explicá-la são a heterocariose, aneuploidia, recombinação, mutação e o envolvimento de elementos genéticos de transposição. Ainda pouco é conhecido sobre os mecanismos de transferência de material genético usados por este patógeno.

Os protoplastos, células artificialmente desprovidas de parede, podem ser obtidos em fungos a partir de micélio e de conídios germinados ou não. Nos últimos quarenta anos, desde o primeiro relato de isolamento de protoplastos em fungos filamentosos, estes tornaram-se importantes ferramentas a serem empregadas em estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, e recentemente têm constituído ferramentas biológicas importantes para a manipulação genética de fungos filamentosos, enfatizando o estudo de genética clássica e molecular (Schiestl & Petes, 1991; Peberdy, 1995). Eles são requeridos para a fusão somática de indivíduos pertencentes a gêneros ou espécies distintas, para a determinação do número, tamanho de cromossomos e localização de genes específicos em cromossomos por meio de PFGE, eletroforese em campo pulsado (Peberdy, 1979).

A remoção da parede celular ocorre pela ação de enzimas líticas, em meio osmoticamente balanceado. Para cada fungo, a preparação de enzimas, estabilizadores osmóticos e sua concentração devem ser otimizadas a fim de se estabelecer as condições ideais para a preservação dos protoplastos e evitar a perda de material interno (Azevedo, 1998). Além da espécie fúngica e do tipo de célula utilizada, a liberação de protoplastos depende de fatores tais como,

composição do meio de cultivo, o tipo e concentração da enzima lítica, do estabilizador osmótico e do tempo de exposição à enzima durante o processo de digestão.

Os protoplastos são capazes de recuperar a parede celular quando expostos à meios de cultivo apropriados, regenerando-se e dando origem assim ao micélio.

Análises de natureza genética em *C. sublineolum* são escassas, devido provavelmente à dificuldade do estabelecimento de mecanismos de transferência de material genético na espécie. Seu ciclo sexual ainda é desconhecido e sequer foi determinado o número de grupos de ligação na espécie.

A necessidade de otimizar a metodologia de obtenção de protoplastos, possíveis de serem empregados em técnicas que permitam o entendimento da genética desta espécie, como o cariótipo molecular, motivaram a avaliação da eficiência de enzimas líticas na protoplastização de *C. sublineolum*. O tempo de digestão enzimática e a regeneração dos protoplastos foram avaliados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Linhagens de *Colletotrichum sublineolum***

As linhagens selvagens utilizadas de *C. sublineolum* foram obtidas da coleção de cultura do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo – Embrapa Sete Lagoas/MG-Brasil. As linhagens mutantes para o gene da nitrato redutase, foram as obtidas por Fávaro (2004), e depositadas no banco de linhagens do Laboratório de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR-Brasil (Tabela 01). As linhagens selvagens foram mantidas em meio Batata Dextrose Agar (BDA) e as linhagens mutantes em meio completo para manutenção de mutantes *nit*

(Fávaro *et al.*, 2007) substituindo-se o  $\text{NaNO}_3$  por Glutamato de Sódio 1,87g/L) e incubadas à 25°C sob luz contínua por sete dias e mantidas neste mesmo meio em geladeira.

## 2.2. Obtenção de protoplastos

O protocolo para a obtenção de protoplastos de *C. sublineolum* foi otimizado a partir do descrito por Thon *et al.* (2000) e Barcellos (2002). Para a obtenção dos protoplastos a partir de pontas de hifa, o micélio de culturas de 7 dias foi raspado com alças de metal, de forma a se obter pequenos fragmentos de micélio, e estes foram inoculados em frascos contendo 50mL de meio Caldo Batata Dextrose (BD). Os inóculos foram incubados por 18hs, à 25°C  $\pm$  2 sob agitação (90rpm). Após esse período o micélio foi filtrado em gaze e lavado com solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6M pH 5,8 (tampão SNS) (Barcellos, 2002) abundantemente para a retirada de conídios. O peso úmido do micélio de cada linhagem foi estimado e para cada mg de micélio, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de tampão SNS e a enzima lítica *Lysing enzyme* (Sigma) ou Glucanex (Novozymes) na proporção de 5% do peso do micélio. Incubou-se sob agitação (90rpm) à 25°C  $\pm$  2 até a formação dos protoplastos, a qual foi monitorada em microscópio óptico. Após a protoplastização, a solução foi filtrada em filtro formado por uma camada de lã de vidro recoberta por uma camada de gaze. O filtrado foi centrifugado por 30 minutos a 6000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 5mL de solução tampão SNS e centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais uma vez. O número de protoplastos foi estimado em câmara de Neubauer.

Para a obtenção de protoplastos a partir de esporos ovais, três discos de micélio, com 10mm de diâmetro cada, foram inoculados em 50mL do meio caldo

batata dextrose. As culturas foram mantidas sob agitação a 90 rpm durante 48h à 25°C com fotoperíodo de 12h. Após a incubação o cultivo foi filtrado em gaze esterilizada para a retirada do micélio, e o filtrado foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os conídios foram ressuspensos em água destilada esterilizada e novamente centrifugados. O mesmo processo foi repetido ressuspendendo os conídios em tampão SNS e novamente centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, o número de conídios ovais foi estimado em Câmara de Neubauer e a concentração da suspensão foi ajustada para 1 a 2 x 10<sup>8</sup> conídios/mL. Para cada mL da suspensão foram adicionados 10mg, 25mg ou 50mg da Lysing enzyme ou 25mg, 50mg e 100mg da enzima Glucanex. Uma vez acrescentadas às enzimas, o material foi incubado sob agitação (90rpm) à 25°C ± 2 até a protoplastização. Após a protoplastização, seguiu-se a mesma metodologia descrita para obtenção de protoplastos a partir de micélio. A produção de protoplastos foi quantificada em câmara de Neubauer.

### **2.3. Regeneração de protoplastos**

A regeneração dos protoplastos foi realizada segundo protocolo descrito por Paccola-Meirelles (1988). Os protoplastos obtidos foram diluídos em tampão SNS e 100 µL dessa suspensão foram plaqueados em placas de petri com 15mL de meio completo (Pontecorvo *et al.*, 1953) e acrescido de solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2M pH 5,8 (1:1). Para protoplastos obtidos de linhagens mutantes foi utilizado o meio completo para manutenção de mutantes *nit* (Fávaro *et al.*, 2007). O mesmo procedimento foi realizado em meio completo sem estabilizador osmótico como controle.

**Tabela 1.** Linhagens de *C. sublineolum* utilizadas no trabalho.

<b>Linhagens</b>	<b>Fenótipo</b>
204.01	Selvagem
15B.15	Mutante Nit M
15E.15	Mutante <i>nit1</i>

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento de protoplastos

Sucesso na protoplastização em *C. sublineolum* foi obtido nos dois materiais fúngicos avaliados, pontas de hifa e conídios ovais, dependendo do tratamento lítico empregado. Em pontas de hifas a maior eficiência foi verificada com o uso da enzima Glucanex, na concentração de 5% do peso do micélio. Nestas condições protoplastos foram obtidos com tempo de digestão de 2 horas. O número de protoplastos obtidos nestas condições foi de 1 a  $2 \times 10^5$  protoplastos/mL de tampão (Tabela 2). Quando as pontas de hifas foram tratadas com a enzima *Lysing enzyme*, o tempo de exposição necessário para a liberação de protoplastos foi maior, 3hs na concentração de 5% do peso úmido do micélio, com uma máxima de  $5,5 \times 10^5$  protoplastos/mL para a linhagem 15E.15.

Protoplastos de conídios ovais (Figura 01 e 02) foram liberados somente após tratamento com a enzima Glucanex. A enzima *Lysing enzyme* demonstrou ser ineficiente em digerir a parede das células conidiais. A produção de protoplastos de conídios ovais foi quantificada em 1 a  $2 \times 10^6$  protoplastos/mL com a enzima Glucanex na concentração de 100mg para 3mL de solução com um tempo de exposição de apenas 2 horas. (Tabela 2) A protoplastização destes conídios representa uma ferramenta poderosa na condução de estudos de diferenciação

celular, biotecnologia e em programas de natureza genética. Este é o primeiro relato de produção de protoplastos, obtidos a partir de hifas e conídios ovais de *C. sublineolum*.

### 3.2. Regeneração dos protoplastos

A regeneração dos protoplastos em *C. sublineolum* foi relativamente rápida, com as primeiras colônias surgindo no quinto ou sexto dia de incubação.

A frequência de regeneração de protoplastos foi maior quando os protoplastos foram isolados a partir de pontas de hifas, utilizando-se a enzima Lysing enzyme, com 36,5% de regeneração. Enquanto que a frequência de regeneração de protoplastos isolados de conídios ovais foi de 25% (Tabela 3).

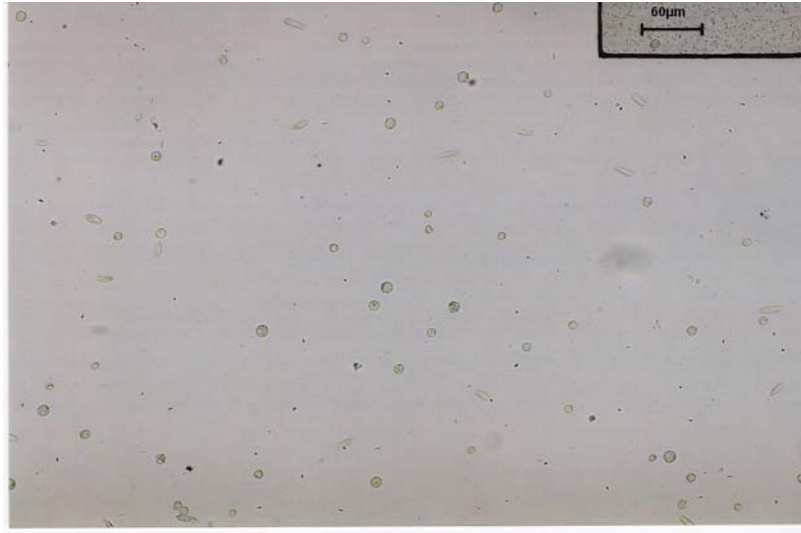
**Tabela 2.** Produção de protoplastos em linhagens selvagens e mutantes de *C. sublineolum* após tratamento enzimático de pontas de hifa e conídios ovais.

Enzima	Protoplastos/mL					
	204.01		15B.15		15E.15	
	Hifa	Conídio Oval	Hifa	Conídio Oval	Hifa	Conídio Oval
Glucanex (50mg/g de micélio)	1,0 x 10 <sup>6</sup>	-	1,5 x 10 <sup>6</sup>	-	1,5 x 10 <sup>6</sup>	-
Glucanex (100mg/3mL de solução)	-	2,2 x 10 <sup>6</sup>	-	2,7 x 10 <sup>6</sup>	-	2,5 x 10 <sup>6</sup>
Lysing enzyme (50mg/g de micélio)	1,5 x 10 <sup>5</sup>	-	2,5 x 10 <sup>5</sup>	-	5,5 x 10 <sup>5</sup>	-

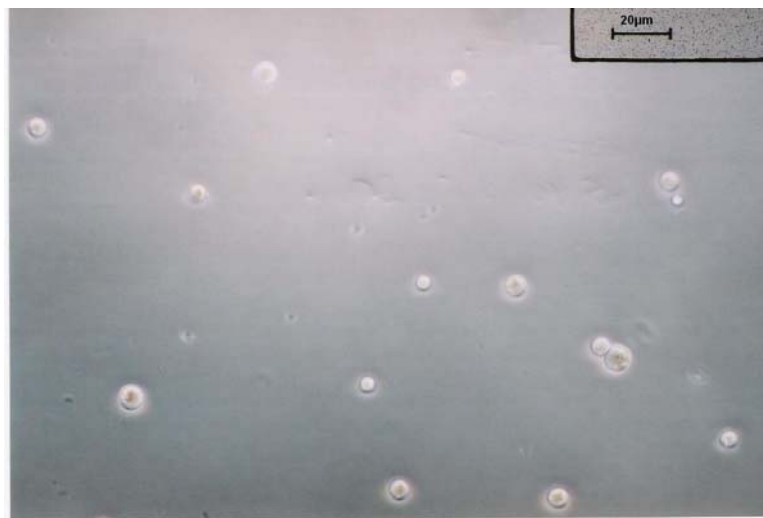
**Tabela 3.** Regeneração de protoplastos de linhagens mutantes e selvagens de *C. sublineolum* após tratamento enzimático de pontas de hifa e conídios ovais

Enzima	Regeneração de protoplastos					
	204.01		15B.15		15E.15	
	Hifa	Conídio Oval	Hifa	Conídio Oval	Hifa	Conídio Oval
Glucanex (50mg/g de micélio)	12%	nr	11%	nr	12%	nr
Lyzing enzyme (50mg/g de micélio)	12,6%	nr	36,5%	nr	22%	nr
Glucanex (100mg/3mL de solução)	nr	25%	nr	15%	nr	10%

Legenda: **nr** – não realizado



**Figura 01.** Protoplastos da linhagem 15B.15 de *C. sublineolum* obtidos a partir de conídios ovais (Aumento de 50X).



**Figura 02.** Protoplastos da linhagem 15B.15 de *C. sublineolum* obtidos a partir de conídios ovais (Aumento de 125X).

#### 4. DISCUSSÃO

Condições de produção, regeneração e reversão de protoplastos têm sido bem documentadas (Peberdy, 1979). Protoplastos de fungos são estruturas interessantes para estudos biológicos e genéticos, pois podem ser fusionados e os seus produtos de fusão podem ser revertidos em células osmoticamente estáveis (Daboussi & Gerlinger, 1992) e a sua regeneração serve como um modelo para o estudo de vários processos celulares e em células fúngicas, é essencial para a manipulação genética (Peberdy, 1995).

A parede celular de conídios ovais de *C. sublineolum* apresentou baixa sensibilidade a *Lyzing enzyme*. Porém, ao ser submetida à digestão com *Glucanex*, um aumento expressivo na produção de protoplastos pode ser observado.

A frequência e regeneração obtida em cada experimento está relacionada à enzima lítica e ao tampão osmótico utilizados no experimento (TeBeest & Weidemann, 1990). Neste trabalho os protoplastos obtidos com o uso da enzima *Lyzing enzyme* apresentaram uma maior frequência de regeneração do que os obtidos com o uso da enzima *Glucanex*, que por sua vez foi mais eficiente na digestão da parede celular. A frequência de regeneração dos protoplastos também varia de espécie para espécie. Varavallo *et al.* (2004) obtiveram para *Penicillium brevicompactum* uma frequência de regeneração de 36,58% similar à encontrada neste trabalho. Para *Metarhizium flavoviride*, um fungo entomopatogênico, a Kuklinsky-Sobral *et al.* (2004) observaram uma frequência de regeneração que variou de 6,65 a 27,92% entre as quatro linhagens testadas, indicando que a frequência de regeneração está relacionada também ao isolado testado. Elbouami (2001), regenerou protoplastos de *Fusarium solani* obtendo uma frequência de regeneração de 3 a 30% quando a enzima lítica empregada foi a citoelicase e de 20

a 30% quando a enzima foi a Novozym, demonstrando a variação na frequência ligada a enzima lítica empregada no experimento. Entretanto para *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, a frequência de regeneração esteve relacionada com a molaridade do tampão osmótico empregado no experimento e ao tipo de tampão, apresentando uma variação de 80 a 84% de frequência de regeneração com sucrose à 0,6M de  $MgSO_4$  mas apenas 20% dos protoplastos regeneraram em tampão manitol à 0,7M (TeBeest & Weidemann, 1990).

Protoplastos de outras espécies de *Colletotrichum* têm sido obtidos e utilizados em estudos genéticos (Rodriguez & Yoder, 1987; TeBeest & Weidemann, 1990; Daboussi & Gerlinger, 1992). Este protocolo de protoplastização é um passo importante para a realização de novos estudos genéticos, tais como fusão de protoplastos, obtenção de transformantes e determinação do cariótipo molecular de *C. sublineolum*. Sendo este o primeiro relato de produção de regeneração de protoplastos nesta espécie.

Neste trabalho uma metodologia para a obtenção de protoplastos de *C. sublineolum* foi estabelecida. Sendo que estes podem ser obtidos rápida e facilmente a partir de conídios ovais e pontas de hifas dependendo do sistema lítico utilizado.

## 5. REFERÊNCIAS

Azevedo, JL, 1998. *Genética de microrganismos*. Goiânia. Goiás: Editora UFG.p. 478.

Barcellos, FG, 2002. *Caracterização genética e citológica da recombinação somática em Trichoderma pseudokoningii*. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo.

Daboussi, MJ, Gerlinger, C, 1992. Parasexual cycle and genetic analysis following protoplast fusion in *Nectria haematococca*. *Current Genetics*, 21, 385-392.

Elbouami, L, 2001. Isolation and regeneration of protoplasts from mycelium of *Fusarium solani*. *African Crop Science Journal*, 9, 351-358.

Favaro, LCL, 2004. *Instabilidade genética em Colletotrichum sublineolum, agente causal da antracnose em sorgo*. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Fávaro, LCL, Araújo, WL, Souza-Paccola, EA, Azevedo, JL, Paccola-Meirelles, LD 2006. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. *Mycological Research*, 111, 93-105.

Ferreira, ES, Casela, CR, Fernandes, FT, 1988. Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo – Doenças na cultura do sorgo. *Embrapa milho e Sorgo – Circular Técnica*, 1, 53-69.

Kuklinsky-Sobral, J, Luna-Alves-Lima, EA, Araújo, JM, Azevedo, JL, (2004). Genetic variability in regenerated *Metarhizium flavoviride* protoplasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 1-6.

Paccola-Meirelles, LD, 1988. *Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto Beauveria bassiana (Bals.) VUILL*. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiros, Universidade de São Paulo.

Panaccione, DG, McKierman, M, Hanau, RM, 1988. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1, 113-120.

Peberdy, JF, 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33, 21-39.

Peberdy, JF, 1995. Fungal protoplasts. in: *The Mycota II Genetics and Biotechnology*, Springer-Verlag. New York, 49-60.

Pontecorvo, G, Roper, JA, Hemmons, LM, McDonald, KD, Bifton, AWJ, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5, 141-238.

Rodriguez, RJ, Yoder, OC, 1987. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. Phaseoli (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene*, 54, 73-81.

Schiestl, RH, Petes, TD, 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 7585-7589.

TeBeest, DO, Weidemann, GJ, 1990. Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. Aeschynomene. *Mycologia*, 82, 249-255.

Thon, MF, Nuckles, EM, Vaillancourt, LJ, 2000. Restriction Enzyme-Mediated Integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 1356-1365.

Varavallo, MA, Queiroz, MV de, Pereira, JF, Araújo, EF de, 2004. Isolation and regeneration of *Penicillium brevicompactum* protoplasts. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 26, 475-479.