

Recombinação Genética em *Colletotrichum Graminicola* Isolados de Sorgo, Através da Parassexualidade

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

¹Edneia A. S. P., ²Léia C. F., ³Carlos R. C. e ²Luzia D. P. M.

¹Departamento de Agronomia (CCA/UEL), ²Departamento de Biologia (CCB/UEL), ³ EMBRAPA Milho e Sorgo (CNPMS). Correspondência para L.D Paccola-Meirelles, CCB/UEL, Caixa Postal 6001, CEP 860051-990, E-mail: paccola@uel.br

Palavras – Chave: heterocário, ciclo parassexual, parameiose, mutantes

Introdução

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wilson (sin. *C. sublineolum* P. Henn. In Kabat & Bubák) é uma das mais importantes doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e o uso de cultivares resistentes constitui a principal medida para seu controle. Entretanto a alta variabilidade genética apresentada por *C. graminicola* (Ferreira *et al.*, 1985) é um fator que dificulta o manejo da doença através da resistência genética, na medida em que esta pode ser superada pelo surgimento de novas raças na população do patógeno (Ferreira, 1988). Esser e Kuenen (1967) sugerem a heterocariose e recombinação mitótica no processo de parassexualidade como alternativas para a interação genética entre fungos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência da parassexualidade em *C. graminicola* em isolados de sorgo e verificar a possibilidade de troca de material genético em plantas inoculadas com conídios mutantes.

Materiais e Métodos

Linhagens: Foram utilizados os mutantes previamente obtidos com luz UV e estes encontram-se descritos na Tabela 1. As linhagens selvagens e mutantes foram cultivadas meio sólido de Farinha de Aveia e Completo de Pontecorvo (Pontecorvo *et al.*, 1953), respectivamente, sob luz contínua à temperatura de 25°C.

Obtenção do heterocário: Suspensões contendo 10⁶ conídios/mL de conídios ovais e/ou falcados de *C. graminicola*, provenientes de duas linhagens mutantes, portadoras de marcas nutricionais complementares, foram misturadas e inoculadas em tubos contendo 2,5 ml meio mínimo acrescido de 4% de meio completo. Após 7 dias de incubação a 25°C, a película formada foi transferida para meio mínimo sólido. Após 20 dias de crescimento a 25°C, sob luz branca fluorescente contínua foi possível observar o crescimento irregular do heterocário.

Seleção e caracterização de recombinantes: Suspensões de conídios falcados provenientes do heterocário foram diluídas em solução salina 0,85% e plaqueadas em meio mínimo e em meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento. Heterocários que não produziram conídios falcados foram induzidos a produzir conídios ovais. Para tanto, o micélio heterocariótico foi colocado em meio mínimo líquido e mantido à 25°C por 5 dias em cultura agitada. Após o crescimento, o micélio foi filtrado e centrifugado. O pellet foi ressuspenso e a suspensão contendo esporos ovais foi plaqueada em meio mínimo e em meios seletivos para as marcas

envolvidas no cruzamento. As colônias crescidas nos meios seletivos foram transferidas para meio completo em placas com 26 pontos (placas mestras). Após 10 dias de crescimento a 25°C, essas colônias foram analisadas quanto às marcas genéticas, conforme descrito por Azevedo e Costa (1973). Em cada cruzamento estimou-se o tamanho médio dos conídios falcados e ovais das linhagens parentais e dos conídios provenientes do heterocáριο, através de ocular micrométrica. Linhagens selvagens, mutantes e segregantes foram avaliadas quanto ao perfil eletroforético de α e β esterases, conforme descrito por Paccola-Meirelles *et al.* (1988).

Tabela 1. Linhagens mutantes e selvagens de *C. graminicola* utilizadas neste estudo.

Tabela 1 – Mutantes de <i>C. graminicola</i> obtidos após tratamento com luz UV e seus respectivos fenótipos		
Selvagem ¹	Linhagens mutantes	Fenótipo ⁽²⁾
243	243.2	Glu ⁻ , preto
	243.1/1	Ben ^R , branco
	243.1/2	Ben ^R , laranja forte
	243.1/3	Ben ^R , cinza
30C Bio ⁻	30C/Cyc	Cyc ^R
	30C/Cyc/8	Cyc ^R , branco
15B Bio ⁻	15B/42	Nic ⁻ , rosa claro
	15B/45	Paba ⁻ , rosa claro
	15B/46	Piro ⁻ , rosa claro
	15B/51	Tia ⁻ , rosa claro
145 Bio ⁻	145.2	Tia ⁻

(1) Todas as linhagens foram deficientes para Biotina (Bio⁻)

(2) Os símbolos Glu⁻, Paba⁻, Piro⁻, Tia⁻, Nic⁻ representam deficiência para biotina, ácido glutâmico, ácido p-aminobenzóico, piridoxina, tiamina e ácido nicotínico respectivamente. Os símbolos Ben^R e Cyc^R representam resistência ao fungicida Benomyl e à Ciclohexamida.

Teste de patogenicidade: Plantas de sorgo de 25 dias de idade foram inoculadas com suspensão de conídios falcados ou ovais (10⁶ conídios mL⁻¹ em água). Após o aparecimento das lesões, estas foram desinfectadas e o patógeno reisolado. A avaliação foi feita observando a presença ou ausência de lesões nas folhas das plantas.

Resultados e Discussão

Formação do heterocáριο: Quatro combinações entre as linhagens mutantes foram usadas para obter heterocários (243.1/2 x 243/2; 15B/42 x 243.1/2; 15B/42 x 30C/Cyc/8 e 145.2 x 30C/Cyc/8). Nem todas as linhagens mutantes esporularam

(145.2 e 243.1/2) em meio sólido, o que representa uma dificuldade para a produção de heterocários e posterior seleção de segregantes. Desta forma heterocários foram formados a partir de conídios ovais produzidos em cultura líquida por esses parentais. Os conídios ovais representaram uma ferramenta útil em estudos de natureza genética nesta espécie, principalmente em linhagens com baixa ou nenhuma esporulação. O cruzamento entre os mutantes, permitiu uma avaliação da ocorrência de heterocariose na espécie. Este fenômeno é importante para os fungos uma vez que em um organismo haplóide ele permite condições similares a da diploidia mantendo uma heterozigose. Além do mais a heterocariose pode permitir alta flexibilidade de adaptação uma vez que as relações nucleares dentro de um heterocáριο podem ser alteradas por mudanças no meio (Azevedo, 1976). A maioria das recombinações ocorre durante a meiose, mas, no entanto, a recombinação mitótica tem sido descrita em muitos fungos e ocupa papel importante no processo de variabilidade genética na espécie (Gu e Ko; 1998; 2000).

Análise dos produtos recombinantes: Colônias originadas de conídios falcados e ovais retirados dos heterocários foram analisadas em meios seletivos, para detectar a presença de recombinantes (Tabela 2). Estes resultados demonstram a possibilidade de utilização dos dois tipos de conídios em estudos genéticos nesta espécie, principalmente em linhagens que não produzem conídios em cultura sólida. Neste trabalho foram recuperados diretamente do heterocáριο, aneuplóides, recombinantes haplóides e parentais. Os aneuplóides liberaram setores continuamente (Tabela 2). Este processo foi denominado por Bonatelli Jr. *et al* (1983), em *Aspergillus niger*, de parameiose para explicar um tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos, nos quais o processo de permuta mitótica e haploidização ocorre ainda no interior das hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico. Esse processo explica o aparecimento de colônias que setorizam com frequência. Bagagli *et al.* (1990) e Paccola-Meirelles e Azevedo (1991) obteve também recombinantes haplóides e/ou aneuplóides diretamente do heterocáριο em *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, respectivamente. Eles observaram uma frequência alta de aneuplóides e haplóides recombinantes quando comparada com a frequência de diplóides no ciclo parassexual convencional, descrito por Pontecorvo e Roper (1952) em *A. nidulans*. Segundo estes autores, os diplóides quando ocorrem, são altamente instáveis e originam haplóides por não disjunção cromossômica. Esta haploidização ocorre ainda no estágio de hifa, e durante este processo, pode ocorrer permuta mitótica. Assim, as colônias que liberam setores continuamente após várias repicagens, são provavelmente aneuplóides ainda em processo de haploidização. Este processo pode representar um mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos imperfeitos.

Teste de patogenicidade: Suspensão de conídios ovais (10^6 conídios/ml) dos parentais 15B/42 e 243.1/2, e conídios ovais de dois segregantes deste cruzamento foram inoculados por spray em plantas de sorgo de 25 dias de idade em vasos na casa de vegetação. Os segregantes demonstraram-se mais virulentos em relação aos parentais. Após o aparecimento das lesões nas folhas, estas foram retiradas e o fungo reisolado. Estes resultados indicam uma vez mais a recombinação entre as linhagens, gerando produtos virulentos. O ciclo parassexual pode explicar diversos fenômenos incluindo a emergência de novas raças fisiológicas (Azevedo, 1976). Com a obtenção do heterocáριο, foi possível verificar a presença de recombinantes e sugerir a ocorrência do ciclo parassexual com parameiose nesta espécie. É uma evidencia de que a

variabilidade genética de *C. graminicola* possa estar envolvida com o ciclo parassexual.

Padrão eletroforético para esterases: Na figura 1 podem ser visualizados os padrões eletroforéticos para esterase de alguns recombinantes obtidos do cruzamento 15B/42 x 243.1/2 e 30C/Cyc/8 x 15B/42. O padrão de bandas desses segregantes permitiu evidenciar uma mistura de bandas dos tipos parentais e o surgimento de novas combinações de bandas nos recombinantes, o que confirma a heterocariose seguida de parassexualidade com parameiose nesta espécie.

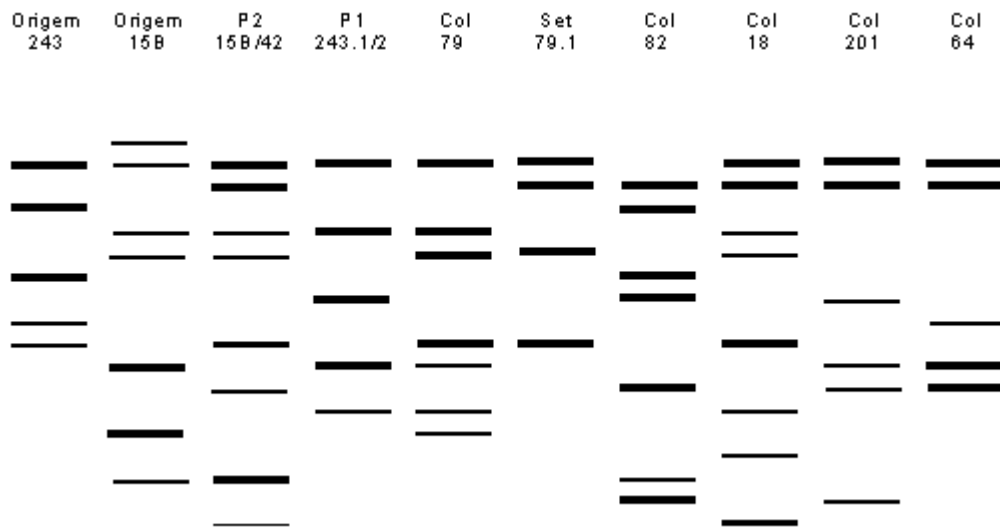


Figura 1. Padrão eletroforético de esterases de alguns recombinantes de *Colletotrichum graminicola* em gel de poliacrilamida, entre o cruzamento dos mutantes 15B/42 x 243.1/2.

(P2 = Parental 2; P1 = Parental 1; Col = Colônia; Set = Setor da Colônia)

Tabela 2. Número de recombinantes obtidos em cruzamentos parassexuais com parameiose de *Colletotrichum graminicola* isolados de sorgo.

Cruzamento	Colônias analisadas	Recombinantes ⁽¹⁾	Morfologia	Número observado
		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Branco	1
(Conídio Falcado)		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Cinza	1
15B/42 x 243.1/2	225	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Cinza escuro	1
Bio ⁻ Nic ⁻ Ben ^S x Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	65% (P)**	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Branco	4
Rosa Claro x Laranja Forte	35% (R)**	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Rosa Claro	3
		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Marrom	19*
		Bio ⁻ Nic ⁻ Ben ^S	Marrom	50
(Conídio Oval)		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Branco	1
15B/42 x 243.1/2	432	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Rosa Claro a Marrom	4
Bio ⁻ Nic ⁻ Ben ^S x Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	76% (P)	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^R	Marrom	16
Rosa Claro x Laranja Forte	24% (R)	Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Marrom	17*
		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Cinza	4
		Bio ⁻ Nic ⁺ Ben ^S	Rosa Claro	61*
		Bio ⁻ Nic ⁻ Ben ^R	Rosa Claro	1
(Conídio Falcado)		Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^S	Rosa Claro	20
15B/42 x 30C/Cyc/8	120	Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^S	Laranja Rosado	8
Bio ⁻ Nic ⁻ Cyc ^S x Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^R	67,5% (P)	Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^R	Marrom	8
Rosa Claro x Laranja Claro	32,5% (R)	Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^S	Rosa Claro	3
(Conídio Oval)		Bio ⁻ nNic ⁺ Cyc ^R	Preto	4
15B/42 x 30C/Cyc/8	241	Bio ⁻ nNic ⁺ Cyc ^R	Cinza	1
Bio ⁻ Nic ⁻ Cyc ^S x Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^R	66% (P)	Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^S	Rosa Claro	76*
Rosa Claro + Laranja Claro	34% (R)	Bio ⁻ Nic ⁺ Cyc ^S	Laranja + Cinza	1

(1) As marcas Bio⁻ Nic⁻ correspondem a deficiência nutricional para biotina e ácido nicotínico e as marcas Ben^R e Cyc^R, resistência à Benomyl e Ciclohexamida, respectivamente, Bens e Cycs, suscetibilidade ao Benomyl e Ciclohexamida. * Presença de setores nas colônias. ** (P) Parentais, (R) Recombinantes

Conclusão

Trocas genéticas dentro da espécie de *C. graminicola* são possíveis, através da parassexualidade, especificamente por um mecanismo de parameiose.

Literatura Citada

AZEVEDO, J. L. e COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo: Companhia Editorial Nacional, EDUSP, 1973.

AZEVEDO, J. L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. Summa Phytopathology, v. 2, p. 3-15, 1976.

BAGAGLI, E., VALADARES, M.C.C., AZEVEDO, J. L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Revista Brasileira de genética, v. 14, p. 261-271, 1990.

BONATELLI, Jr. R., AZEVEDO, J. L., VALENT, G. U. Parasexuality in a citric acid

producing strain of *Aspergillus niger*. Revista Brasileira de Genética. v. 6, n. 3, p. 399-405, 1983.

ESSER, K. e KUENEN, R. Genetics of Fungi. Springer Veriag. New York, 1967.

FERREIRA, A. S., FREDERIKSEN, R. A., WARREN, H. L. e CARDWELL, K. L. Identification of races of *Colletotrichum graminicola* in Brazil. Sorghum Newsletter, v. 28, p. 80-83, 1985.

Ferreira, A. S.; Casela, C. R.; Fernandes, F. T. Doenças na cultura do sorgo. In: EMBRAPA-CNPMS (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 01), p. 53-69, 1988.

GU, Y. H. e KO, W. H. Occurrence of parasexual cycle following the transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Phytophthora parasitica*. Current Genetics, v. 34, n. 2, p. 120-123, 1998.

GU, Y. H. e KO, W. H. Occurrence of parasexual cycle in *Phytophthora parasitica* following protoplast fusion. Botanical Bulletin of Academia Sinica. v.41, n. 3, p. 225-230, 2000.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D., VALARINI, M. J., Azevedo, J. L. e Alfenas, A.C. Manual de técnicas eletroforéticas em Microrganismos. Piracicaba: FEALQ. 1988, p.54.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. e Azevedo, J. L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology. v. 57, p. 172-176, 1991.

PONTECORVO, G. e ROPER, J. A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. Journal Genetic Microbiology. 6vii, 1952.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M., McDONALD, K. D. e BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulas*. Adv. Genet., v. 5, p. 141-238, 1953.