

PRODUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

PRODUCTION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS FROM *Colletotrichum gloeosporioides* IN DIFFERENT CONDITIONS

Cecilia ARMESTO¹; Fernanda Gonçalves Martins MAIA¹; Mário Sobral de ABREU²;
Antônia Figueira dos REIS³; Nara Edreira ALENCAR⁴

1. Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil. cecirpj@hotmail.com feagrosal@yahoo.com.br; 2. Professor, Doutor, Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças - Departamento de Fitopatologia - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 3. Professora, Doutora, Laboratório de Fitovirologia e Biologia Molecular - Departamento de Fitopatologia - UFLA, Lavras, MG, Brasil. 4. Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitopatologia, UFLA, Lavras, MG, Brasil

RESUMO: A obtenção de protoplastos de fungos, utilizando-se enzimas degradadoras de parede celular, tem sido o método mais utilizado em processos de transformação genética. Foram testados dois tipos de estruturas fúngicas (micélio e conídios), diferentes concentrações enzimáticas (5, 10, 20 mg), estabilizadores osmóticos (NaCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,7; (NH₄)₂SO₄ 1,2 mol.L⁻¹ pH 5,8; KCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,8; MgSO₄ 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,5; Sacarose 0,5 mol.L⁻¹ pH 5,7; Sorbitol 0,6 mol.L⁻¹ pH 5,7) e seis tempos de exposição dos protoplastos ao sistema lítico, para estabelecer condições otimizadas de obtenção e regeneração de protoplastos de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente relacionado a mancha manteigosa em cafeeiros. Protoplastos de *C. gloeosporioides* foram obtidos em maior quantidade quando o micélio foi exposto durante 4 horas, com 10 mg.mL⁻¹ de Lysing Enzyme em KCl 0,7 mol.L⁻¹ que se apresentou como melhor estabilizador osmótico, com frequência de regeneração de 11,64%.

PALAVRAS-CHAVE: Protoplastos. Digestão Enzimática. Estabilizadores.

INTRODUÇÃO

A mancha manteigosa, relacionada ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma doença cujos principais sintomas são observados em folhas e frutos de café (*Coffea arabica*), pelo aparecimento de manchas de coloração verde-claro com aspecto oleoso, as quais, em estádios avançados, evoluem para lesões necróticas, causando queda prematura das folhas (MANSK; MATIELLO, 1977). Esta é uma doença de grande importância nas lavouras em que ocorre, devido à destruição completa da planta e ainda hoje não esclarecida quanto à sua infecção e colonização (PEREIRA et al., 2009).

No Brasil, o gênero *Colletotrichum*, associado ao cafeeiro, além de relacionado com a mancha manteigosa, causa doenças como a antracnose em folhas, ramos e frutos e a seca de ponteiros (OROZCO, 2003). Vários são os estudos sobre o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro. Recentemente, técnicas de transformação genética têm sido exploradas objetivando desvendar passos sobre a transmissibilidade e a variabilidade do fitopatógeno.

Transformação genética refere-se ao processo de inserção de fragmentos de DNA exógeno em uma célula hospedeira, com a finalidade de promover a alteração genética do

organismo receptor, ou a expressão de tal DNA, permitindo assim o estudo de aspectos da biologia molecular de organismos vivos (MULLINS; KANG, 2001). A preparação de protoplastos a partir de células fúngicas utilizando várias enzimas degradadoras da parede celular é um método comumente usado na preparação de células para a transformação (ZANETTE, 2007).

Protoplastos são células desprovidas de parede celular, tornando-as receptoras e permeáveis à entrada do DNA exógeno. Especialmente em fungos filamentosos, que apresentam espessa parede celular, a protoplastização parece ser uma etapa essencial para uma transformação bem sucedida (POSSIEDE, 2004).

Segundo Peberdy (1991) dentre os principais fatores envolvidos na protoplastização são: a) o estado fisiológico das células a serem convertidas em protoplastos; b) o estabilizador osmótico que deve proporcionar um alto rendimento de protoplastos; c) o composto lítico utilizado, que pode influenciar tanto na obtenção como na regeneração dos protoplastos.

Diante das perspectivas apresentadas, objetivou-se estabelecer um protocolo para obtenção de protoplastos de *C. gloeosporioides*, analisando concentrações do sistema lítico, tipos de

estabilizadores osmóticos, tempos de protoplastização e regeneração destes.

MATERIAL E MÉTODOS

Colletotrichum gloeosporioides

Foi utilizado o isolado IS1, pertencente à coleção micológica do Laboratório de Diagnose e Controle de Doenças de Plantas, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG, Brasil).

O isolado foi mantido em meio de cultura MEA (Extrato de malte 2% - Ágar), em câmara de crescimento a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Obtenção de protoplastos

Para a obtenção dos protoplastos, 1 mL de suspensão de 2×10^6 conídios.mL⁻¹ foi transferida para meio malte líquido (Extrato de Malte - Água Destilada Autoclavada), sob agitação a 120 rpm. Após 24 horas de incubação, o micélio foi filtrado e lavado por duas vezes em estabilizador osmótico. Como procedimento padrão para protoplastização, a cada 100 g de micélio úmido, utilizou-se 3 mL de estabilizador osmótico. Posteriormente, a suspensão foi submetida à agitação a 70 rpm em temperatura ambiente. Para garantir maior confiabilidade foram realizados dois ensaios, no qual para cada tratamento foi aplicado quatro unidades experimentais (erlenmeyer 25 mL). Os protoplastos foram observados ao microscópio ótico e quantificados em câmara de Neubauer.

Tipos de estabilizadores osmóticos

Foi verificada a eficiência dos seguintes estabilizadores osmóticos comumente utilizados na protoplastização de fungos filamentosos: NaCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,7; (NH₄)₂SO₄ 1,2 mol.L⁻¹ pH 5,8; KCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,8; MgSO₄ 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,5; Sacarose 0,5 mol.L⁻¹ pH 5,7; Sorbitol 0,6 mol.L⁻¹ pH 5,7 e o controle (água destilada esterilizada).

Digestão do micélio - Concentração da enzima lítica

Para estabelecer a melhor relação massa micelial x enzima, foram utilizadas três concentrações da enzima lítica (Lysing enzymes, Sigma # L 1393) para a digestão do micélio: 5, 10 e 20 mg.

Tempo de exposição dos protoplastos ao sistema lítico

Detectada a combinação sistema lítico/concentração enzimática/estabilizador osmótico mais eficiente, monitorou-se a

protoplastização em função do tempo de incubação. O tempo de exposição do material ao sistema lítico foi monitorado a cada 60 minutos, em um período total de seis horas. Após o término do tempo de incubação foi determinado o número de protoplastos produzidos utilizando-se câmara de Neubauer.

Tipo de material fúngico

Foram analisados dois tipos de estruturas fúngicas para obtenção dos protoplastos: conídios e micélio de *C. gloeosporioides* obtidos de colônias com sete dias de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Regeneração dos protoplastos

A regeneração dos protoplastos foi realizada plaqueando-se 500 μL da suspensão de protoplastos em 15 mL de Meio Completo (0,1% Extrato de Levedura, 0,1% Caseína Hidrolisada, 34,2% Sacarose, 1% Ágar Granulado) e Meio MEA (25% Extrato de Malte, 5% Ágar,) acrescido de um dos estabilizadores KCl 0,7 mol.L⁻¹, NaCl 0,7 mol.L⁻¹, Sacarose 0,56 mol.L⁻¹ ou Sorbitol 0,6 mol.L⁻¹. Os protoplastos foram incubados por 48 horas, a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Como controle foi utilizado somente meio completo e meio MEA, sem a adição de um estabilizador osmótico. A regeneração dos protoplastos foi calculada de acordo com a fórmula: Regeneração (%) = (A-B) / C x 100, onde A é o número de colônias nos tratamentos testados, B é o número de colônias desenvolvidas no controle, e C o número de protoplastos plaqueados.

Análise dos dados

Utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000) os dados foram inicialmente avaliados pela análise de variância e teste F. A comparação entre as médias, quando o valor de F foi significativo, foi feita pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade. Os gráficos foram elaborados por meio da versão demonstrativa do aplicativo Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar com clareza a diferença entre os estabilizadores osmóticos na protoplastização de *C. gloeosporioides*. Os melhores resultados para a liberação de protoplastos de *C. gloeosporioides*, foram obtidos utilizando KCl 0,7 mol.L⁻¹ e NaCl 0,7 mol.L⁻¹, com $2,7 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ protoplastos.mL⁻¹, respectivamente (Figura 1).

O estabilizador osmótico é um componente importante no processo de protoplastização, pois

deve promover condições favoráveis para a atividade enzimática e, principalmente, após a remoção da parede celular, o soluto deve garantir a

integridade da célula até a síntese da nova parede (MARCHI et al., 2006).

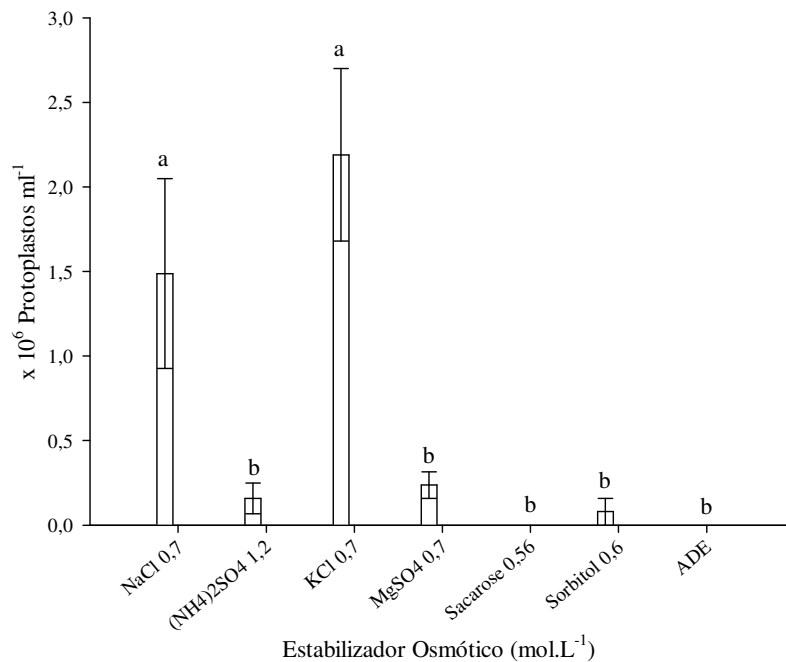


Figura 1. Média da produção de protoplastos de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes estabilizadores osmóticos. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem pelo Teste de Scott-Knott, $P < 0,05$. Barra representa o erro padrão da média.

Resultados semelhantes, utilizando sais como estabilizadores osmóticos na protoplastização de *C. lindemuthianum* foram relatados por Ishikawa et al. (2010), que obtiveram $9,6 \times 10^5$ e 8×10^5 protoplastos.mL⁻¹ utilizando NH₄Cl 0,6 mol.L⁻¹ e NaCl 0,37 mol.L⁻¹, respectivamente.

Constatou-se maior eficiência entre os estabilizadores salinos aos compostos por açúcares. Segundo Lalithakumari (1996), sais inorgânicos são preconizados como mais eficientes para a protoplastização de fungos filamentosos, enquanto açúcares ou açúcares-álcoois como mais apropriados para a liberação de protoplastos de leveduras.

Não foi verificada diferenças na utilização das três concentrações testadas das enzimas líticas na obtenção dos protoplastos de *C. gloeosporioides*. Mesmo não demonstrando um incremento na protoplastização de *C. gloeosporioides*, Ishikawa (2010), Lalithakumari (1996) e Marchi (2006), relatam o aumento na produção de protoplastos quando usado níveis elevados de enzimas líticas, porém podendo ocorrer também a lise das células, tornando-se tóxico a estas.

Em relação ao tipo de estruturas fúngicas, não houve produção de protoplastos quando

utilizados conídios do fungo, mesmo estes tendo sido submetidos a diferentes tempos de exposição e condições favoráveis de protoplastização. Quando foram utilizadas hifas de *C. gloeosporioides*, houve produção de protoplastos, a partir de duas horas de exposição. Zanette (2007), trabalhando com protoplastos de *Colletotrichum sublineolum* também demonstrou a ineficiência da enzima lítica na digestão de paredes das células conidiais do patógeno, independente do tempo de exposição, porém, quando o tratamento ocorreu em hifas, foram obtidos até $5,5 \times 10^5$ protoplastos. mL⁻¹. Este evento pode ser compreendido pelo fato da parede celular dos conídios ser mais espessa em relação à das hifas, e de composição distinta, o que exige combinações de enzimas mais complexas. Testes com a enzima Glucanex sobre conídios de *C. sublineolum* foram bem sucedidos alcançando a produção de $2,7 \times 10^6$ protoplastos.mL⁻¹.

A protoplastização de *C. gloeosporioides* foi monitorada a cada 60 minutos por um período de 6 horas. Quando atingido o intervalo entre quatro e cinco horas de exposição, ocorreu o máximo de produção de protoplastos havendo a liberação média de $5,1 \times 10^6$ protoplastos. mL⁻¹ (Figura 2); após esse intervalo o número de protoplastos decresce, e os

que permanecem no meio, tornam-se deformados devido a exposição excessiva à enzima. Em diversos microrganismos tem-se reportado a importância do tempo de exposição destas as enzimas líticas sobre a

liberação de protoplastos, e de sua correlação com a concentração da enzima (LONGO et al., 1995.; TEBEEST; WEIDEMANN, 1990).

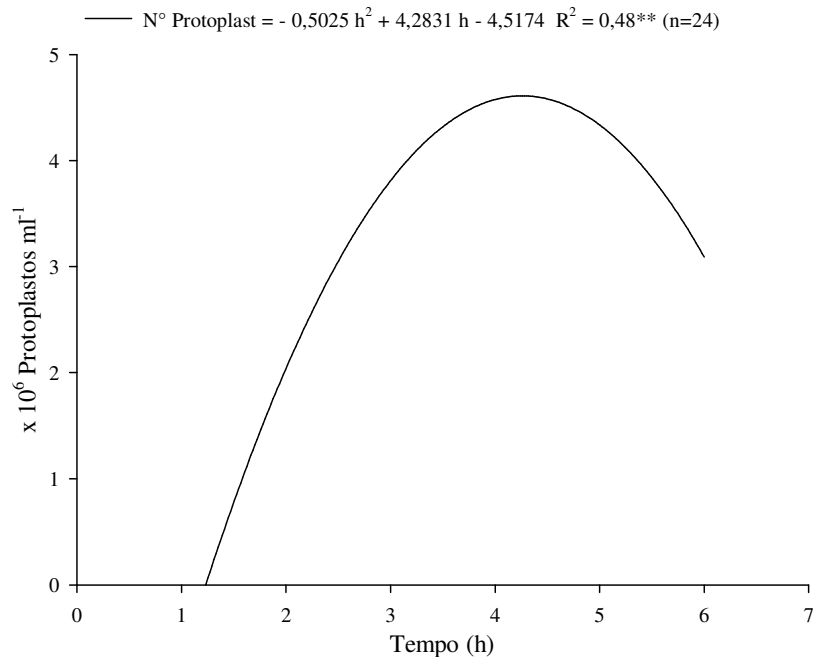


Figura 2. Número médio de protoplastos de *Colletotrichum gloeosporioides* em função do tempo de hidrólise enzimática, utilizado o estabilizador KCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,8 e 10 mg de Lysing enzyme.

Os protoplastos de *C. gloeosporioides* obtidos foram aptos a regenerar formando micélio quando semeados em meio de cultivo. A maior porcentagem de regeneração foi obtida com

protoplastos gerados após 3 horas de hidrólise enzimática, utilizando como meio de regeneração: meio completo acrescido do estabilizador osmótico KCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,8. (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de regeneração de protoplastos de *C. gloeosporioides* em meio completo (MC) e meio malte (MEA) acrescidos de diferentes estabilizadores osmóticos.

Meios de regeneração	% de regeneração
MC+KCl	11,64 a
MC+NaCl	5,85 b
MC+Sacarose	5,77 b
MC+Sorbitol	6,69 b
MEA+KCl	8,32 b
MEA+NaCl	6,28 b
MEA+Sacarose	6,89 b
MEA+Sorbitol	5,85 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste Scott-Knott, P<0,05.

A frequência de regeneração obtida em cada experimento está relacionada à enzima lítica e ao tampão osmótico utilizados no experimento. Para que sejam funcionais nos estudos de fungos

filamentosos, os protoplastos são requeridos em grande número, e principalmente apresentem boa capacidade regenerativa. Contudo, as taxas de regeneração e reversão são dependentes da espécie

fúngica, em geral não atingem 100%. Portanto, o aprimoramento de protocolos deve enfatizar a necessidade de determinar os fatores-chave da protoplastização, para alcançar resultados bem sucedidos (FARIÑA et al., 2004).

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem a maior eficiência de estabilizadores osmóticos oriundos de açúcares na regeneração de fungos filamentosos como, por exemplo, 5% de regeneração para protoplastos de *C. lindemuthianum* utilizando sacarose 0,56 mol.L⁻¹ (ISHIKAWA et al., 2010) e 0,084% para *Phaeoisariopsis griseola* também com sacarose 0,6 mol.L⁻¹ (GONZAGA et al., 2008), para *C. gloeosporioides* a adição de KCl 0,7 mol.L⁻¹ ao meio completo resultou em incremento na regeneração.

Como a liberação de protoplastos é extremamente sensível às condições fisiológicas do micélio, é comum observar certa variação no número obtido entre diferentes ensaios, em função de fatores não controlados, como condição

fisiológica do esporo, oscilação da temperatura do ambiente de cultivo, etc. O importante é gerar um número elevado de protoplastos, uma vez que uma maior quantidade destes é fundamental para a eficiência do processo de transformação (ALMEIDA et al., 2008).

Portanto, um protocolo bem sucedido para obtenção e regeneração de protoplastos de *C. gloeosporioides*, isolado de café, inclui as seguintes condições ideais: utilização de micélio de *C. gloeosporioides* em estabilizador osmótico KCl 0,7 mol.L⁻¹, concentração de 10mg.mL⁻¹ de Lysing enzyme, tempo médio de hidrólise enzimática de 4 horas e meio de crescimento completo com adição de KCl 0,7 mol.L⁻¹ para regeneração.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.

ABSTRACT: The isolation and regeneration of protoplasts from fungal cells, using several cell wall degrading enzymes, has been the most common method to prepare competent cells for genetic studies of filamentous fungi. In this work two types of fungal structures, different enzyme concentrations (5, 10, 20 mg), osmotic stabilizers (NaCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,7; (NH₄)₂SO₄ 1,2 mol.L⁻¹ pH 5,8; KCl 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,8; MgSO₄ 0,7 mol.L⁻¹ pH 5,5; Sacarose 0,5 mol.L⁻¹ pH 5,7; Sorbitol 0,6 mol.L⁻¹ pH 5,7), and six exposure times to establish optimum conditions of isolation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides*, agent of blister spot on coffee, were tested. Protoplast of *C. gloeosporioides* were obtained in greater quantities when the mycelium was exposed for 5 hours with 15mg.mL⁻¹ of Lysing Enzyme in 0.7 mol.L⁻¹ of KCl as osmotic stabilizer, presenting a regeneration rate of 11.64%.

KEYWORDS: Protoplasts. Enzymatic digestion. Stabilizers.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. M. M.; DIAS, E.S.; PEREIRA, R. T. G.; TOLEDO, R. C. C.; PFENNING, L. H. Production of protoplasts from the filamentous fungus *Aspergillus ochraceus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1460-1462, 2008.
- FARIÑA, J. I.; MOLINA, O. E.; FIGUEROA, L. I. C. Formation and regeneration of protoplasts in *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 254-262, 2004.
- GONZAGA, L. L.; LIMA, S. S.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Obtenção e regeneração de protoplastos em *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum. In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 54.
- ISHIKAWA, F. H.; BARCELOS, Q. L.; DE SOUZA, E. A.; DIAS, E. S. Factors affecting the production and regeneration of protoplasts from *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 74-79, 2010.
- LALITHAKUMARI, D. Protoplasts - a biotechnological tool for plant pathological studies. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 49, p. 199-212, 1996.

LONGO, A. C. ; SCHRANK, A. ; AZEVEDO, J. L. Transformação genética para *Colletotrichum musae*, com o gene heterólogo de resistência a benomil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 18, n. Supl., p. 176, 1995.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café “Conilon” (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MARCHI, C. E.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; QUEIROZ, M. V. DE; MIZUBUTI, E. S. G. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 232-238, 2006.

MULLINS, E. D.; KANGS, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plant. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser Basel, v. 58, n. 14, p. 2043-2052, 2001.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*.** 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

PEBERDY, J. F. Fungal protoplast. In: Bennett, J.W.; Lasure, L. L. (Ed.). **More Gene Manipulations in Fungi**. California: Academic Press, 1991. p. 307-318.

PEREIRA, I. S.; ABREU, M. S.; ALVES, E.; FERREIRA, J. B. Estudos histoplásticos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*: cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfológicos e genéticos em *Guignardia* spp e *Phyllosticta* spp.** 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TEBEEST, D. O, WEIDEMANN, G. J. Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*. **Mycology**, Lawrence, v. 82, n. 2, p. 249-255, 1990.

ZANETTE, G. F. **Caracterização fenotípica e tentativa de obtenção de fase sexuada em *Colletotrichum sublineolum*.** 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.