

SOBREVIVÊNCIA E PRODUÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Colletotrichum karstii* SL57, ISOLADO DE *Serjanea laruttea*

João Pedro de Proença Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/Uem), João Gabriel Dumont Negrelli (PIBIC/CNPq/FA/Uem), João Arthur dos Santos de Oliveira (Coorientador), João Alencar Pamphile (*In memoriam*), Julio Cesar Polonio (Orientador), e-mail: jcpolonio2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Palavras-chave: Endófito, UV, auxotrofia.

Resumo:

Fungos do gênero *Colletotrichum* são capazes de produzir enzimas extracelulares, solubilizar fosfato e produzir hormônios vegetais. O melhoramento genético microbiano por meio de técnicas clássicas empregando agentes mutagênicos químicos e/ou físicos pode contribuir para a obtenção de cepas com melhoria ou introdução de novas características de interesse biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi obter mutantes auxotróficos induzidos por luz ultravioleta do endófito *C. karstii* SL57 isolado da planta *Serjanea laruttea*. A letalidade (L (%)) do endófito após 30 min de exposição foi de 94%. Um total de 20 mutantes putativos foram obtidos, dos quais foram avaliados quanto suas deficiências nutricionais em MM+ uma única fonte de N (5 mM). Dentre os mutantes putativos obtidos, apenas 8 cresceram em MM+ Cys e falharam ao crescer apenas em MM, confirmando seu estado de auxotrofia (Cys⁻). Em conjunto com outras técnicas de melhoramento genético microbiano como a fusão de protoplastos, é possível a partir da fusão de linhagens auxotróficas obter recombinantes prototróficos com atividades aumentadas em relação a suas linhagens parentais selvagens.

Introdução

Fungos do gênero *Colletotrichum* são capazes de produzir enzimas extracelulares (SANTOS et al., 2019), solubilizar fosfato (HIRUMA et al., 2016) e produzir hormônios vegetais (ROBINSON; SHARON, 1998). Visando estas aplicações biotecnológicas, o melhoramento genético microbiano empregando agentes mutagênicos químicos ou físicos (KAVA et al., 1995) pode-se contribuir para a obtenção de cepas com melhoria ou introdução de novas características de interesse (PAMPHILE et al., 2004). Além disso, da variabilidade genética natural existente entre as espécies de fungos, o melhoramento genético visando o isolamento de mutantes espontâneos ou induzidos podem levar a obtenção de cepas microbianas com características favoráveis (PAMPHILE et al., 2004) do ponto de vista biotecnológico para diferentes áreas, como a agricultura. Neste sentido, o objetivo deste projeto foi obter mutantes auxotróficos induzidos por luz

ultravioleta do endófito *C. karstii* SL57 isolado da planta *Serjanea laruttea*na.

Materiais e métodos

Fungo endofítico

A linhagem *C. karstii* SL57 foi resgatada da Coleção de Microorganismos Endofíticos e do Ambiente (CMEA) do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBIOMIC) da Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. UEM – Paraná/ Brasil). O endófito foi cultivado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA; pH 6.6) durante 7 dias à 28°C.

Curva de sobrevivência a Luz Ultravioleta

Uma suspensão do endófito em salina 0,85% foi ajustada para densidade de 0.2 em 600 nm. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi semeada em Meio Completo (MC) (1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,001g/L FeSO₄, 0,001g/L ZnSO₄, 10 g/L Glicose, 2 g/L Extrato de levedura, 2 g/L Peptona, 1,5 g/L Caseína hidrolisada, 1 mL Solução de vitaminas à 5 mM (metionina, valina, cisteína, leucina, alanina, lisina, prolina, arginina, cistina, ácido úrico e triptofano), 15 g/L Ágar, 1000 mL de água destilada; pH 6.8) e irradiada com luz UV-C com intervalo de tempo de 2 min (0 – 30 min).

Posteriormente, as placas foram incubadas a 28°C em ausência de luz. Após este período, as colônias sobreviventes foram contadas para realizar o cálculo da curva da letalidade de acordo com a fórmula $L (\%) = (\text{Número de colônias não tratadas} - \text{número de colônias tratadas} / \text{Número de colônias não tratadas}) \times 100$. Foi tomado o número de colônias obtidas no tempo 0 minutos como 100% de sobrevivência estimando-se deste modo, o tempo de irradiação que permita cerca de 5% de sobrevivência para a linhagem.

Obtenção dos mutantes por filtração e enriquecimento

A suspensão irradiada pelo tempo definido pelo cálculo da letalidade foi transferida para 50 mL de Meio Mínimo (MM) (1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,001g/L FeSO₄, 0,001g/L ZnSO₄, 10 g/L Glicose, 1000 mL de água destilada; pH 6.8) e submetida a agitação a 120 rpm durante 72h. Após cada 24h, o MM foi filtrado por meio de gaze para outro frasco erlenmeyer esterilizado e vazio e novamente agitado no período acima citado. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que após a última filtragem o MM foi transferido para tubos de centrífuga por 15 min à 2750 xg. O sobrenadante foi dispensado e o precipitado suspenso em 2 mL de solução salina esterilizada e foi semeado em MC sólido (0,1 mL por placa). As placas foram incubadas (28°C) por um período de 7 dias. As colônias dos mutantes putativos foram cultivadas em MM e MC. As colônias que não cresceram em MM mas sim em MC, foram consideradas mutantes auxotróficos putativos. O local onde os mutantes serão inoculados no meio sólido MM será transferido para MC. Após 7 dias de incubação a 28°C, cada

isolado será testado quanto às necessidades nutricionais, conforme descrito por Azevedo e Costa (1973) em meios seletivos contendo única fonte de nitrogênio (5 mM).

Resultados e Discussão

A letalidade (L (%)) do endófito *C. karstii* SL57 esta apresentada na Tabela 1. De acordo com a mesma, a letalidade aumentou proporcionalmente ao tempo de exposição ocorrendo uma letalidade de 94% em 30 min de tratamento.

Tabela 1. Avaliação da letalidade do fungo endofítico *Colletotrichum karstii* SL57 a luz ultravioleta durante 30 minutos (com intervalo de tempo de 2 min).

Tempo	Número de colônias	Letalidade	Tempo	Número de colônias	Letalidade
0 min	513	0%	16 min	93	81,87%
2 min	290	43,46%	18 min	88	82,84%
4 min	253	50,68%	20 min	87	83,04%
6 min	247	51,85%	22 min	70	86,35%
8 min	230	55,16%	24 min	65	87,32%
10 min	211	58,86%	26 min	60	88,30%
12 min	192	62,57%	28 min	49	90,44%
14 min	163	68,22%	30 min	30	94,15%

Da suspensão irradiada durante 30 min. (L (%))= 94, um total de 20 mutantes putativos foram obtidos, dos quais foram avaliados quanto suas deficiências nutricionais em MM+ uma única fonte de N (5 mM). Para avaliação das deficiências nutricionais, 11 fontes de nitrogênio foram utilizadas: ácido úrico (UA), prolina (Pro), arginina (Arg), triptofano (Trp), lisina (Lys), metionina (Met), valina (Val), alanina (Ala), leucina (Leu), cisteína (Cys) e cistina (Cyst). Dos 20 mutantes putativos obtidos, apenas 8 cresceram em MM + Cys e falharam ao crescer apenas em MM, confirmando seu estado de auxotrofia.

A obtenção de mutantes auxotróficos de linhagens microbianas de interesse, especialmente aquelas endofíticas, têm-se apresentado como uma ferramenta promissora para aplicações biotecnológicas. A obtenção destes mutantes pode empregar agentes físicos (luz UV e outras radiações ionizantes) como químicos (Bromato/ Clorato de Potássio). A descrição de mutantes auxotróficos de fungos do gênero *Colletotrichum* já foi descrito anteriormente para resistência a agentes químicos (ROSADA et al., 2010) e físicos como a luz UV (DICKMAN; PATIL, 1986; LAKSHMESHIA et al., 2005).

Conclusões

Aqui, relatamos a obtenção de oito mutantes auxotróficos (Cys⁻) do fungo endofítico *C. karstii* SL57 após a exposição a luz UV de 30 min, empregando a técnica para o isolamento de enriquecimento e filtração. Em

conjunto com outras técnicas de melhoramento genético microbiano como a fusão de protoplastos, é possível a partir da fusão de linhagens auxotróficas, intra ou interespecíficas, obter-se recombinantes prototróficos com atividades aumentadas em relação a suas linhagens parentais selvagens.

Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

Referências

- AZEVEDO, J.L.; COSTA. S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: EDUSP, 1973. 288p.
- DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.28, p. 235-242, 1986.
- HIRUMA, K.; GERLACH, N.; SACRISTÁN, S.; NAKANO, R. T.; HACQUARD, S.; KRACHER, B.; SCHULZE-LEFERT, P. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. **Cell**, v.165, n.2, 464–474, 2016.
- SANTOS, C. M.; RIBEIRO, A. S.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta biol. Colomb**, v. 24, p. 1, 2019.
- KAVA, V.; LUNA-ALVES-LIMA, E. Á.; AZEVEDO, J. L. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola** (USP. Impresso) **JCR**, Piracicaba, v. 52, n.3, p. 548-554, 1995.
- LAKSMESHA, K. K.; LAKSHMIDEVI, DR.; ARADHYA, M. Changes in pectinase and cellulase activity of *Colletotrichum capsici* mutants and their effect on Anthracnose disease on capsicum fruit. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 38, n. 5, p. 267-279, 2005.
- PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; AZEVEDO, J. L. Co-transformation of a tropical maize fungal endophyte isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes. **Genetics and Molecular Biology JCR**, v. 27, n.2, p. 253-258, 2004
- ROBINSON, M.; SHARON, J. R. A. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.5030-5032, 1998.
- ROSADA, L. J.; FRANCO, C.; SANTANNA, J. R.; KANESHIMA, E. N.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; CASTRO-PRADO, M. A. A. Parasexuality in race 65 *Colletotrichum lindemuthianum* isolates. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.57, p.383-384, 2010.