

MAYCON CAMPOS OLIVEIRA

Identificação e caracterização dos genes *abcC1* e *cypC1* que codificam um transportador ABC e um citocromo P450 no fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

MAYCON CAMPOS OLIVEIRA

Identificação e caracterização dos genes *abcC11* e *cypC11* que codificam um transportador ABC e um citocromo P450 no fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de Fevereiro de 2009

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Co-orientadora)

Prof^a Denise Mara Soares Bazzoli
(Co-orientadora)

Prof^o Hilário Cuquetto Mantovani

Prof^o Olinto Liparini Pereira

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

Dedico

Aos meus pais,

*“... Se um dia, já homem feito e realizado,
sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronaram,
que não há ninguém a tua volta para te estender a mão,
esquece tua maturidade, passa pela tua mocidade,
volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças,
as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai.”*

(Rui Barbosa)

A minha namorada,

*“Eu te amo porque te amo, Não precisas ser amante, e nem sempre sabes sê-lo.
Eu te amo porque te amo. Amor é estado de graça e com amor não se paga.
Amor é dado de graça, é semeado no vento, na cachoeira, no eclipse.
Amor foge a dicionários e a regulamentos vários.
Eu te amo porque não amo bastante ou demais a mim. Porque amor não se troca,
não se conjuga nem se ama. Porque amor é amor a nada, feliz e forte em si mesmo.
Amor é primo da morte, e da morte vencedor, por mais que o matem (e matam)
a cada instante de amor.”*

(Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus amigos,

*“Perguntei a um sábio, a diferença que havia entre amor e amizade,
ele me disse essa verdade... O Amor é mais sensível,
a Amizade mais segura. O Amor nos dá asas, a Amizade o chão.
No Amor há mais carinho, na Amizade compreensão.
O Amor é plantado e com carinho cultivado, a Amizade vem faceira,
e com troca de alegria e tristeza, torna-se uma grande e querida
companheira. Mas quando o Amor é sincero
ele vem com um grande amigo, e quando a Amizade é concreta,
ela é cheia de amor e carinho. Quando se tem um amigo
ou uma grande paixão, ambos sentimentos coexistem dentro do seu coração.”*

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e perseverança durante toda a minha vida acadêmica.

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento e pela maturidade que obtive nesses últimos sete anos.

Ao Departamento de Microbiologia da UFV pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À professora Marisa Vieira de Queiroz pela orientação dedicada, pela confiança e pela amizade.

Às professoras Elza Fernandes de Araújo e Denise Mara Soares Bazzolli pela co-orientação e pelos ensinamentos tão preciosos para a minha formação.

Ao professor Hans VanEtten pelo fornecimento da fitoalexina pisatina.

Aos professores Hilário Cuquetto Mantovani e Olinto Liparini Pereira pela disponibilidade e pela valiosa contribuição científica na banca de defesa da dissertação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos e pelo auxílio durante o curso.

Aos meus pais pela orientação de vida, amor, dedicação, constante apoio e incentivo.

Ao meu irmão, Diogo, e a todos os meus familiares pelo carinho e pela torcida.

Ao meu grande amor, a doce Swiany, não só pela atenção e carinho, mas também pela ajuda teórica e experimental. Afinal foi no dia-a-dia do laboratório que ela ganhou meu coração!

Ao Márcio e a Lúcia, os meus pais adotivos em Viçosa, pelo amparo e caloroso afeto.

Aos meus irmãos de coração Daniel, Sávio, Marcão, Guilherme e Rodrigo Siqueira, pelo companheirismo e pela forte amizade que para sempre nos unirá.

Ao meu grande amigo José Osmar, pela parceria desde os tempos de Alojamento Velho e pelo exemplo de ser humano que me inspira.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, meus professores práticos; obrigado pela ajuda: Francis, pelo meu primeiro meio de cultura e primeira extração de plasmídeos; Jorge, pela minha primeira extração de DNA de fungos e hibridização; Jildete, meu primeiro gel de agarose; Ronney, primeira transformação de fungo; Swiany e Leandro, meu primeiro teste de patogenicidade; Rodrigo Barros, pela ajuda com o RAPD; João Batista, minha primeira e única extração de proteínas nucleares e o primeiro a me cobrar o cafezinho; Ximena, minha primeira hibridização em placas de lise; Gilvan, minha primeira extração de DNA de fago; Viviane e Mariana, pela ajuda nas clonagens e análise de sequências, Daniel, minha primeira eletroforese em campo pulsado; Mariana Fontenelle e Ireninha, minha primeira extração de RNA de fungo e meu primeiro PCR em tempo real. Obrigado também Marcos Soares, Patrícia, Klédna, Tatiana, Rafael Tomaz, Guilherme, Darlene, Júnio, Lara, Leonardo, Rodrigo Siqueira, Michelle, Ana Paula, Juline, Mateus, Leandro L., Fábio, Mariane, Marina, Jaqueline, Rafael, Carolina, Francisco, Felipe, Ana Karina, Juliana, Janaína, Ana Angélica, Natália, Andréia, André e Rodrigo. A todos vocês agradeço pela amizade, pelo auxílio, pela agradável convivência no laboratório e pela divertida companhia no cafezinho.

Aos meus amigos de república Fábio, Vinícius, Leo Bilú, Fernando, Victor, Tesfahun, Eduardo, Paulo, Luckas, Bruno, Fabrício, Henrique e Marcelo, pela paciência, companheirismo e amizade.

Aos meus amigos de graduação, de mestrado e dos Laboratórios de Fisiologia, Micorrizas, Microbiologia de Alimentos, Petróleo, Café e Microbiologia Industrial.

Enfim, a todos os amigos que fiz em Viçosa, e graças a Deus não foram poucos.

BIOGRAFIA

Maycon Campos Oliveira, filho de José Antônio de Oliveira e Maria de Lourdes Avelar Campos Oliveira, nasceu no dia 09 de Maio de 1983, em Pitangui – Minas Gerais.

Em Maio de 2002, iniciou o curso de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Bacharel em Outubro de 2006.

Em Março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura do feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
2.2. Antracnose do feijoeiro.....	4
2.3. Mecanismos de resistência a compostos tóxicos empregados por fungos	5
2.4. Citocromo P450.....	8
2.5. Transportador ABC	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Microrganismos, condições de cultivo e estocagem	14
3.2. Obtenção da sequência completa dos genes <i>abcCl1</i> e <i>cypCl1</i>	14
3.3. Análises por hibridização.....	15
3.4. Inativação do gene <i>abcCl1</i>	17
3.5. Teste de patogenicidade	19
3.6. Análise da expressão relativa dos genes <i>abcCl1</i> e <i>cypCl1</i>	19
4. RESULTADOS	22
4.1. Isolamento e caracterização dos genes <i>abcCl1</i> e <i>cypCl1</i>	22
4.2. Análises do número de cópias dos genes <i>abcCl1</i> e <i>cypCl1</i> no genoma do isolado A ₂ 2-3 da raça 89 de <i>C. lindemuthianum</i>	30
4.3. Inativação do gene <i>abcCl1</i>	32
4.4. Análise da expressão relativa dos genes <i>abcCl1</i> e <i>cypCl1</i>	35
5. DISCUSSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS	46

RESUMO

OLIVEIRA, Maycon Campos. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2009. **Identificação e caracterização dos genes *abcC11* e *cypC11* que codificam um transportador ABC e um citocromo P450 no fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Denise Mara Soares Bazzoli.

Para se defenderem de fungos fitopatogênicos, as plantas produzem proteínas antifúngicas e antibióticos especializados (fitoanticipinas e fitoalexinas). Somente patógenos que conseguem evitar estas respostas defensivas da planta nos estágios iniciais da infecção são capazes de causar doença. O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara é o agente etiológico da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), uma importante doença que contribui para redução da produtividade da cultura do feijoeiro no Brasil. Neste fitopatógeno foram isolados dois genes, *abcC11* e *cypC11*, cujas sequências de aminoácidos deduzidas possuem alta similaridade com transportadores ABC e citocromos P450, respectivamente. Estes genes estão presentes em cópia única e agrupados no genoma do fungo, conforme revelado no sequenciamento de um fragmento de DNA de 8,4 kb da biblioteca genômica de *C. lindemuthianum*, bem como no perfil de hibridização. Estes genes também apresentam aumento de expressão em resposta a diferentes compostos tóxicos, principalmente quando o fungo é crescido na presença de eugenol, higromicina ou fitoalexina pisatina. Assim, além de seus genes estarem ligados fisicamente, as proteínas ABCC11 e CYPC11 podem, também, estarem envolvidas em um mesmo processo funcional: a resistência do fungo a compostos tóxicos produzidos por plantas ou microrganismos antagonistas. Na análise funcional do gene *abcC11*, foi observado que mutantes *abcC11*⁻ apresentam redução na virulência a folhas de feijoeiro comum, em comparação com a linhagem selvagem de *C. lindemuthianum*. Estes resultados indicam que o gene *abcC11* codifica um transportador ABC, que é necessário para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*, provavelmente por conferir ao fungo a capacidade de superar algum mecanismo de defesa da planta. O citocromo P450, codificado pelo gene *cypC11*, pode representar um mecanismo complementar de destoxificação empregado por este fungo durante o estabelecimento da doença.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Maycon Campos. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Identification and characterization of the genes *abcC11* and *cypC11* that codify an ABC transporter and a cytochrome P450 in phytopathogen *Colletotrichum lindemuthianum*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Denise Mara Soares Bazzolli.

The plants produce antifungous proteins and specialized antibiotics (phytoanticipins and phytoalexins) in order to defend from phytopathogenic fungus. Only the pathogens able to avoid those defensive plant responses at the initial stages of the infection are able to cause disease. The fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara is the etiological agent of the anthracnose in the common bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.), that is an important disease contributing to reduce the productivity of the bean plant crop in Brazil. The genes *abcC11* and *cypC11* were isolated from this phytopathogen and their deduced aminoacid sequences have high similarity with ABC transporters and cytochromes P450, respectively. Those genes are found in unique copy and clustered in genome of the fungus, as revealed by either the sequencing of one DNA 8,4 kb fragment from the genomic library of *C. lindemuthianum* and the hybridization profile. Those genes also show an increased expression in response to different toxic compounds, mainly when the fungus is grown at the presence of eugenol, hygromycin and pisatin phytoalexin. Therefore, besides their genes to be physically linked, the proteins ABCC11 and CYPC11 can also be involved in the same functional process: the fungus resistance to the toxic compounds produced by plants or antagonistic microorganisms. In the functional analysis of the gene *abcC11*, the mutants *abcC11⁻* showed reduction in their virulence to the leaf of the common bean plant, compared with the wild line of *C. lindemuthianum*. Those results indicate the gene *abcC11* to codify an ABC transporter that is necessary to pathogenicity of *C. lindemuthianum*, probably because providing the fungus with the ability to overcome the defense mechanism of the plant. The cytochrome P450, that is codified by the gene *cypC11*, can represent a complementary detoxification mechanism used by this fungus during the establishment of the disease.

1. INTRODUÇÃO

A habilidade em resistir a compostos tóxicos constitui uma característica indispensável para a sobrevivência dos microrganismos. Os fungos fitopatogênicos, por exemplo, desenvolveram diversas estratégias para se protegerem contra compostos tóxicos produzidos por plantas e microrganismos antagonistas. Estas estratégias de defesa incluem tanto mecanismos não-degradativos, quanto mecanismos enzimáticos de detoxicação e degradação de compostos tóxicos, empregando uma grande variedade de enzimas, como acetiltransferases, hidrolases, hidratases, dimetilases e, principalmente, monoxigenases dependentes de citocromo P450.

Entre os mecanismos de resistência não-degradativos destacam-se os sistemas de bombas de efluxo transmembrana, principalmente alguns membros da superfamília dos transportadores ABC, os quais vêm recebendo considerável atenção nos últimos anos.

Os transportadores ABC são proteínas transmembrana, que fazem transporte ativo primário e podem funcionar como bombas de efluxo de metabólitos tóxicos. Em fungos fitopatogênicos, estes transportadores podem atuar como importantes fatores de virulência, necessários principalmente nos primeiros estágios da infecção, por conferirem ao fungo resistência contra compostos de defesa da planta (fitoalexinas).

Transportadores ABC envolvidos no efluxo de fungicidas ou fitoalexinas têm sido relatados em vários fungos filamentosos, como *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter, *Botrytis cinérea* Pers., *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., e outros.

A observação, segundo a qual, os transportadores ABC e os citocromos P450 influenciam a sensibilidade do fungo a fungicidas e atuam como fatores de virulência, implica que estas proteínas constituem um alvo atrativo para o controle químico. Neste contexto, inibidores de transportadores ABC e citocromos P450 poderiam reduzir a virulência de fungos fitopatogênicos e melhorar a eficácia do controle químico.

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara é o agente etiológico da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), uma importante doença que contribui para a redução da

produtividade da cultura do feijoeiro no Brasil. Atualmente, o combate à antracnose é realizado, principalmente, por meio do uso de cultivares de feijoeiro resistentes à doença. Entretanto, esta estratégia ainda é limitada, pois, a grande variabilidade genética apresentada por *C. lindemuthianum* resulta em frequente quebra de resistência dos cultivares comerciais. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos mais eficientes e duradouros para o controle da antracnose, o que requer maior conhecimento sobre os determinantes patogênicos de *C. lindemuthianum*.

Neste trabalho são descritos dois genes, *abcC1* e *cypC1*, que codificam um transportador ABC e um citocromo P450, respectivamente, no fitopatógeno *C. lindemuthianum*. O principal objetivo deste estudo foi inativar o gene *abcC1* e testar a virulência dos mutantes isolados em folhas de feijoeiro, a fim de avaliar a função deste gene na patogenicidade de *C. lindemuthianum*. Outro objetivo foi avaliar a expressão diferencial dos genes *abcC1* e *cypC1* na presença de diferentes compostos tóxicos, empregando-se a técnica da PCR em tempo real

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em praticamente todas as regiões brasileiras, o feijoeiro comum (*P. vulgaris*) apresenta grande importância econômica e social. Os grãos de feijão, que constituem um dos alimentos básicos da população brasileira, representam uma importante fonte protéica, além de possuírem bom conteúdo de carboidratos e ferro (Vieira *et al.*, 2006).

O feijão representa também uma importante fonte de fósforo, magnésio, manganês e, em menor grau, zinco, cobre e cálcio. Com um nível de consumo de 15-20 kg/ano, normalmente encontrado na dieta alimentar da população de baixa renda, o feijão proporciona 10 a 20% dos requerimentos de nutrientes necessários a uma pessoa adulta (Broughton *et al.*, 2003).

O feijoeiro comum apresenta ampla adaptação edafoclimática, o que possibilita seu cultivo em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e, ou consorciado, durante o ano todo, em quase todos os Estados. Isto favorece a diversificação da produção, além de manter o homem no campo e o abastecimento agroalimentar da população brasileira (EMBRAPA).

No Brasil, a cultura do feijão é uma atividade exercida principalmente por pequenos e médios produtores rurais. As lavouras com área inferior a 10 hectares (ha) somam 75% do universo de lavouras nacionais de feijão, as lavouras de 10 a 100 ha representam 19%, enquanto as de 100 a 500 ha somam 4% do universo. Entretanto, as lavouras com mais de 500 ha somam apenas 2% da área cultivada com feijão no Brasil (Fuscaldi & Prado, 2005).

O Brasil constitui o maior produtor mundial de feijão comum. Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a estimativa para a produção nacional de feijão na safra 2008/2009 é de 3.592,4 milhões de toneladas numa área plantada de 4.124,6 milhões de hectares. No entanto, a produtividade estimada de 871 kg/ha continua bem abaixo da produtividade obtida por países mais desenvolvidos como os Estados Unidos, onde a produtividade da cultura de feijão em 2007 foi de 1.923 kg/ha (FAO).

No Brasil, onde o feijoeiro é cultivado durante todo o ano, numa grande

diversidade de ecossistemas, inúmeros fatores tornam-se limitantes à sua produtividade. Entre os principais fatores estão as doenças que, além de diminuir a produção da cultura, depreciam a qualidade do produto.

2.2. Antracnose do feijoeiro

A antracnose do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, é uma das doenças mais importantes desta cultura, afetando, em todo o mundo, os cultivares suscetíveis cultivados em locais com temperaturas de moderadas a frias e alta umidade relativa (Vieira *et al.*, 2006). O patógeno ataca as partes aéreas da planta e produz lesões, que contêm uma massa conidial revestida por uma camada mucilaginosa que, em contato com água, é capaz de disseminar e infectar os tecidos saudáveis (Tu, 1981; Tu, 1983; Tu, 1988). O fungo sobrevive, na forma de conídio ou de micélio, em restos culturais ou em sementes infectadas (Dillard & Cobb, 1993). Do ponto de vista epidemiológico, as sementes infectadas constituem a maior fonte de inóculo, pois, são responsáveis pela disseminação da doença a longas distâncias (Vieira *et al.*, 2006).

A antracnose do feijoeiro foi descrita pela primeira vez por Saccardo, em 1878, no “Agricultural Institute of Poppelsdorf” em Bonn, Alemanha e a denominação antracnose foi usada pela primeira vez por Scribner, em 1888 (Barrus, 1921).

Várias estratégias de controle têm sido propostas para este patógeno. A estratégia mais usada é o emprego de cultivares de feijoeiro resistentes (Tu, 1983; Ragagnin *et al.*, 2003; Alzate-Marin *et al.*, 2007). Entretanto, o controle genético da antracnose por meio de cultivares melhorados é complexo devido à grande variabilidade genética e, conseqüentemente, fisiológica do fungo (Sicard *et al.*, 1997). O desenvolvimento bem sucedido de cultivares resistentes à antracnose depende de um entendimento dos níveis de variabilidade dentro de uma mesma população, bem como entre as diferentes populações do patógeno (Rodriguez-Guerra *et al.*, 2003).

Além do entendimento dos mecanismos geradores de variabilidade em *C. lindemuthianum*, a identificação de seus determinantes patogênicos também seria de grande utilidade no desenvolvimento de métodos mais eficientes e duráveis para o controle da doença.

Os fungos fitopatogênicos empregam diversas estratégias para infectar seus hospedeiros. Atualmente, tais estratégias vêm sendo mais bem entendidas devido ao crescente emprego da genética molecular. Em particular, as técnicas de mutagênese (sítio dirigida ou aleatória) têm permitido a identificação de genes que, são indispensáveis ao estabelecimento da doença. Desta forma, genes ou fatores de virulência foram identificados com funções na formação de estruturas de infecção, degradação da parede celular, superação ou neutralização das defesas da planta, resposta ao ambiente hospedeiro, produção de toxinas e em cascatas de sinais. Os tipos de genes essenciais para a patogenicidade dependem do processo de infecção utilizado por um fungo em particular. Um gene com uma função exclusiva na patogenicidade em todos os fungos fitopatogênicos, um “gene de patogenicidade universal”, provavelmente, não existe (Idnurm & Howlett, 2001).

Entretanto, por meio de comparações entre grupos de patógenos, processos-chaves, comuns para a patogenicidade podem ser evidenciados. Assim, uma vez identificado em um organismo, um determinante patogênico pode ser sistematicamente testado a fim de determinar sua importância em outros organismos relacionados.

Durante a última década, vários genes bem como mecanismos de patogenicidade foram descritos em fungos (Schafer, 1994; Oliver & Osbourn, 1995; Hamer & Holden, 1997; Knogge, 1998; Idnurm & Howlett, 2001). Nos últimos anos, mais genes de patogenicidade têm sido identificados, principalmente em fungos que são de fácil manipulação, como o agente causal da brusone do arroz, *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr (Sweigard *et al.*, 1998). Neste microrganismo, a interrupção do *ABC1*, por exemplo, um gene que codifica um transportador ABC (*ATP-Binding Cassete*), resultou perda da patogenicidade. Além disso, foi demonstrado que este gene é induzido por compostos tóxicos e por sakuranetina, uma fitoalexina do arroz, o que lhe sugere um papel essencial no efluxo, pelo fungo, de metabólitos da planta (Urban *et al.*, 1999).

2.3. Mecanismos de resistência a compostos tóxicos empregados por fungos

Na natureza, os microrganismos são constantemente expostos a diversos compostos tóxicos originados de várias fontes. Em especial, os fungos

filamentosos encontram, em seu habitat, diversos antibióticos produzidos por outros microrganismos, são expostos a fungicidas químicos e podem precisar manejar tóxicos de origem endógena, como as micotoxinas. Além disso, para se defenderem de fungos fitopatogênicos, as plantas produzem proteínas antifúngicas (Dixon & Lamb, 1990; Dixon *et al.*, 1994) assim como antibióticos especializados, conhecidos como fitoanticipinas (VanEtten *et al.*, 1994) e fitoalexinas (Müller & Börger, 1940). Somente patógenos que conseguem evitar estas respostas defensivas da planta, nos estágios iniciais da infecção, são capazes de ocasionar a doença (Urban *et al.*, 1999).

Os fungos fitopatogênicos desenvolveram diversas estratégias, para se protegerem contra compostos tóxicos produzidos por plantas e microrganismos antagonistas. Estas estratégias de defesa incluem tanto mecanismos não-degradativos quanto mecanismos enzimáticos de destoxificação e degradação (Morrissey & Osbourn, 1999; VanEtten *et al.*, 2001; Duffy *et al.*, 2003).

VanEtten *et al.* (2001) propuseram que os fungos fitopatogênicos empregam três mecanismos principais de tolerância a fitoalexinas e fitoanticipinas: (1) destoxificação mediada por modificação enzimática da substância tóxica; (2) exclusão ativa da fitoalexina ou fitoanticipina mediada por uma bomba de efluxo; e (3) modificação do componente celular alvo da toxina.

Várias enzimas, contendo uma ampla ou limitada especificidade de substrato, são empregadas por fungos para a degradação ou destoxificação enzimática de compostos tóxicos. Essas enzimas são, principalmente, acetiltransferases, hidrolases, hidratases, dimetilases, e monoxigenases dependentes de citocromo P450 (Morrissey & Osbourn, 1999; VanEtten *et al.*, 2001). Estas últimas são particularmente interessantes, pois, geralmente possuem uma ampla especificidade de substrato e são hemoproteínas que, atipicamente, podem catalisar vários tipos de reações, além de reações oxidativas como monoxigenação e desidrogenação, reações não-oxidativas, como desidratação ou isomerização, já foram relatadas (Mansuy, 1998).

Os fungos também podem adquirir resistência a compostos tóxicos, por meio da modificação do sítio-alvo dessas substâncias. Esta estratégia pode ser empregada para resistência a algumas fitoanticipinas (Morrissey & Osbourn, 1999; VanEtten *et al.*, 2001) e, especialmente, para resistência a fungicidas (Steffens *et al.*, 1996; Fernandez-Ortuno *et al.*, 2008).

Finalmente, substâncias tóxicas podem ser ativamente exportadas para fora das células por meio de proteínas transmembrana, a fim de reduzir a concentração do composto tóxico em seu local de ação. Em fungos, assim como em todos os organismos, várias famílias de proteínas integrais de membrana podem mediar o transporte de compostos tóxicos naturais através das membranas biológicas. Entretanto, nestes microrganismos, duas classes principais de transportadores de membrana estão envolvidas com resistência a drogas, a família dos transportadores ABC (*ATP-Binding Cassete*) e a família dos transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Transportadores ABC são capazes de ligar e hidrolisar nucleotídeos trifosfatos (principalmente ATP) e, assim, catalisar o transporte de solutos através de membranas celulares. Isto pode ocorrer mesmo contra um gradiente de concentração e, por esta razão, os transportadores ABC representam uma classe de sistemas de transporte ativo primário (Azzaria *et al.*, 1989). Eles compreendem um grande número de bombas de efluxo, que medeiam o transporte de uma ampla variedade de agentes tóxicos endógenos ou exógenos (Higgins, 1992; Higgins, 2007). Os transportadores MFS não requerem ATP para sua atividade. O transporte de compostos através de membranas, pelos transportadores MFS, é dirigido pela força próton-motora. Por esta razão, os transportadores MFS são classificados como sendo sistemas de transporte ativo secundário (Lewis, 1994). Mais de 350 uni-, sin-, e antiportes de açúcares, peptídeos, drogas e íons (orgânicos e inorgânicos) são classificados dentro desta superfamília de transportadores (Pao *et al.*, 1998).

Os resultados disponíveis na literatura mostram que, comumente, os transportadores envolvidos na proteção contra compostos de defesa da planta são os transportadores ABC. Isto pode ser devido à relativa ampla gama de substratos utilizados por muitos transportadores ABC, em comparação com os transportadores MFS. É sugerido também que os transportadores ABC estão, fundamentalmente, envolvidos na proteção contra compostos tóxicos exógenos, enquanto os transportadores MFS podem ter evoluído, principalmente, como um mecanismo de secreção de metabólitos endógenos tóxicos (Del Sorbo *et al.*, 2000).

A resistência empregada por fungos contra compostos tóxicos pode ser baseada na combinação dos mecanismos apresentados (VanEtten *et al.*, 2001). Assim, a interrupção de um mecanismo poderá, somente, reduzir

parcialmente a resistência ou, em alguns casos, ser completamente compensada por outros mecanismos. Além disso, a resistência desenvolvida contra um agente tóxico pode também proporcionar resistência a outra substância química não relacionada. Este fenômeno de resistência multidrogas (*MDR – Multidrug resistance*) é, frequentemente, observado em fungos fitopatogênicos, podendo ser mediado por ambos os mecanismos de resistência: degradativos e não-degradativos (de Waard, 1997; Del Sorbo *et al.*, 1997; de Waard *et al.*, 2006; Gulshan & Moye-Rowley, 2007).

2.4. Citocromo P450

Os citocromos P450 representam um grande grupo de hemoproteínas, que atuam como oxidases terminais de cadeias de transporte de elétrons multicomponentes, também conhecidas como sistemas de monoxigenases dependentes de citocromo P450. Encontradas em praticamente todos os organismos aeróbios, as monoxigenases dependentes de citocromo P450 (ou, simplesmente, monoxigenases) são enzimas metabólicas extremamente importantes, envolvidas na regulação da bioconversão ou biotransformação de compostos endógenos como hormônios, ácidos graxos e esteróides, bem como no catabolismo de compostos tóxicos como drogas, pesticidas e toxinas de plantas. Como os citocromos P450 podem catalisar uma grande diversidade de reações degradativas e biossintéticas, eles são conhecidos como os mais versáteis catalisadores biológicos (Porter & Coon, 1991; Mansuy, 1998).

A reação geral de hidroxilação, catalisada por uma monoxigenase dependente de citocromo P450 na presença de oxigênio, pode ser representada como



Os elétrons necessários à inserção do oxigênio na molécula do substrato (R) são doados do NAD(P)H ao centro catalítico da enzima por um sistema doador de elétrons à parte. Em mitocôndrias e em procariotos, o sistema doador de elétrons é composto por dois tipos de proteínas: ferredoxina e ferredoxina redutase. Para citocromos P450 localizados no retículo endoplasmático, os elétrons são doados por uma única proteína: citocromo P450 redutase. Em fungos, os citocromos P450 são encontrados, principalmente, no retículo endoplasmático (van den Brink *et al.*, 1998).

Ao contrário da maioria das enzimas, as proteínas da família dos citocromos P450 exibem uma considerável diversidade de substratos e, além da transferência de átomo de oxigênio (monoxigenação) elas podem realizar outras funções catalíticas como, por exemplo, oxidação envolvendo clivagem de ligações C-C ou C=N, redução, desidratação, desidrogenação, isomerização, e outras (Mansuy, 1998; Isin & Guengerich, 2007).

Os genes da superfamília P450 (também chamados *cyp*) são subdivididos e classificados, segundo recomendações de um comitê de nomenclatura (*International Committee on the Nomenclature of Cytochrome P450*; <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), com base na identidade de aminoácidos, bem como em critérios filogenéticos e na organização gênica (Nelson *et al.*, 1996; Nelson, 1999). O número de genes de citocromos P450 encontrados nos genomas de diferentes organismos é bastante variado. No filo *Ascomycota*, os membros da ordem *Pezizales* possuem, em média, cerca de 100 genes que codificam citocromos P450 em seus genomas (Park *et al.*, 2008).

A identidade de sequência entre as proteínas P450 é frequentemente muito baixa, podendo chegar a menos de 20% (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Embora as sequências de aminoácidos dos citocromos P450 não sejam muito conservadas entre diferentes famílias, estas proteínas mantiveram o mesmo dobramento estrutural ao longo da evolução (Degtyarenko, 1995; Hasemann *et al.*, 1995).

Todos os citocromos P450 possuem um sítio catalítico, constituído pela ferroprotoporfirina IX (grupo prostético heme). O átomo de Fe(III) no centro do heme é coordenado por quatro N porfirínicos e um S da cadeia lateral de um resíduo de cisteína. Na forma férrica inativa da enzima, uma molécula de água atua como o sexto ligante ao átomo de ferro (White & Coon, 1980). A presença de um resíduo de cisteína coordenado ao grupo heme é uma característica absolutamente conservada entre os citocromos P450. Aliás, o nome desta classe de proteínas se deve ao fato de seu complexo Fe(II)-CO possuir um espectro de absorção com um pico em 450 nm, o qual é obtido devido à presença de um átomo de enxofre coordenado ao átomo de ferro na posição *trans* ao CO ligante (Omura & Sato, 1962; Mansuy, 1998; Urlacher *et al.*, 2004).

Vários genes envolvidos na patogenicidade de plantas por fungos codificam enzimas P450. Um exemplo é a pisatina demetilase (PDA – *pisatin*

demethylase) de *Nectria haematococca* Berk. & Broome, um patógeno de ervilha (*Pisum sativum* L.). Foi demonstrado que a PDA está envolvida na desmetilação de pisatina, uma fitoalexina produzida pela planta como um agente antimicrobiano (Delserone *et al.*, 1999; George & VanEtten, 2001). Outros genes que codificam citocromos P450 envolvidos na fitopatogenicidade foram isolados de *Fusarium sporotrichioides* Sherb. Nesta espécie, a produção de tricotecnos é requerida como fator de virulência (Proctor *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2002). Potentes inibidores da síntese protéica, os tricotecnos constituem um grupo de micotoxinas sesquiterpenóides produzidas por várias espécies de fungos. Em *F. sporotrichioides*, os genes da via de biossíntese de tricotecnos relacionados com a patogenicidade estão organizados em um agrupamento gênico (Hohn *et al.*, 1993). Três destes genes, *Tri1* (Meek *et al.*, 2003), *Tri4* (Hohn *et al.*, 1995) e *Tri11* (Alexander *et al.*, 1998), são membros da superfamília dos citocromos P450.

2.5. Transportador ABC

Os transportadores ABC compreendem uma das maiores famílias protéicas conhecidas até o momento, operando em ampla variedade de organismos desde bactéria até o próprio homem (Higgins, 1992). Eles estão localizados na membrana plasmática das células ou na membrana de compartimentos internos, como vacúolos, retículo endoplasmático, peroxissomos e mitocôndria. Estes transportadores são capazes de transportar uma enorme gama de citotóxicos, agentes hidrofóbicos, variando de íons a macromoléculas, contra um gradiente de concentração (Ambudkar *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 1999; Del Sorbo *et al.*, 2000; Theodoulou, 2000).

De acordo com as características estruturais e mecanismo de transporte, os transportadores ABC podem ser divididos em três classes: (1) exportadores ABC; (2) importadores ABC tipo I; e (3) importadores ABC tipo II. No entanto, as últimas duas classes só foram encontradas, até o momento, em procariotos, enquanto os transportadores ABC tipo exportadores são amplamente expressos em todos os reinos da vida (Locher, 2009).

As funções fisiológicas dos transportadores ABC em fungos são altamente significativas. Estes transportadores podem promover proteção contra compostos tóxicos presentes em seu habitat natural, ou prevenir acúmulos no citoplasma de metabólitos secundários tóxicos, produzidos pelo

próprio fungo. Além disso, em fungos fitopatogênicos, estes transportadores podem atuar na patogenicidade, se forem responsáveis pela secreção de fatores de virulência, como certas toxinas hospedeiro-específicas, ou promoverem proteção contra compostos defensivos da planta durante a infecção (deWaard, 1997). Se o estágio sexual do fungo estiver presente, os transportadores ABC também podem estar envolvidos na secreção de fatores sexuais (*mating type factors*) e, então, contribuir para a diversidade genética de uma determinada população fúngica (Christensen *et al.*, 1997).

Típicos transportadores ABC de fungos contêm duas regiões intracitoplasmáticas, ambas ancorando domínios de ligação a nucleotídeo (NBF: *Nucleotide-Binding Fold*), responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP, além de duas regiões prevalentemente hidrofóbicas, cada uma contendo seis domínios transmembrana (TMD₆: *six Trans-Membrane Domains*). Eles são codificados por um único gene (Higgins, 1992) e sua estrutura é similar à aquela de todos os transportadores ABC de eucariotos. Dentro da mais comum subfamília de transportadores ABC de fungos, estes quatro domínios apresentam uma topologia (TMD₆-NBF)₂ ou (NBF-TMD₆)₂. Transportadores ABC pertencentes a esta categoria são compostos de 1300-1600 resíduos de aminoácidos, e possuem massas moleculares entre 140-170 kDa. Outras subfamílias de transportadores ABC em fungos são constituídas de apenas dois módulos (NBF-TMD₆) ou (TMD₆-NBF), sendo descritas como transportadores “meio-tamanho” (*half-sized*). Acredita-se que os últimos se tornem funcionais, após montagem em homodímeros ou heterodímeros (Del Sorbo *et al.*, 2000).

Assim como em todas as outras ATPases, o domínio NBF dos transportadores ABC contêm os motivos conservados Walker A e Walker B (Walker *et al.*, 1982). Além destes, uma sequência consenso, (L,V)-SGG-(X)₃-R-resíduo hidrofóbico-X-resíduo hidrofóbico-A, conhecida como assinatura ABC ou motivo C, está presente, precedendo o motivo Walker B. Diferente de outras ATPases, os motivos Walker dos transportadores ABC são separados por 90-120 resíduos de aminoácidos (Hyde *et al.*, 1990). Os TMDs das proteínas ABC são menos conservados, em comparação aos NBFs. Eles podem dar forma a um poro através da bicamada lipídica das membranas (Rosenberg *et al.*, 1997) e são conhecidos por exercer função na determinação da especificidade de substrato dos transportadores. Mais especificamente,

acredita-se que os TMDs 4, 5, 6, 10, 11 e 12, assim como os *loops* extracelulares que os conectam, estejam estreitamente relacionados com os eventos de ligação e transporte do substrato (Greenberger, 1993; Loo & Clarke, 1995; Zhang *et al.*, 1995).

O primeiro transportador ABC de fungo caracterizado foi o PDR5 de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. O PDR5 é um clássico transportador de multidrogas, podendo conferir resistência a muitos tóxicos não-relacionados (Balzi *et al.*, 1994). Atualmente, transportadores ABC envolvidos na patogenicidade ou resistência a compostos antifúngicos já foram clonados e caracterizados em diversos fungos fitopatogênicos ou modelos, como *M. grisea* (Urban *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2006; Gupta & Chattoo, 2008), *Botrytis cinerea* Pers. (Nakajima *et al.*, 2001; Schoonbeek *et al.*, 2001; Del Sorbo *et al.*, 2008), *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc. (Fleibner *et al.*, 2002), *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. (Stergiopoulos *et al.*, 2003; Zwiers *et al.*, 2003), *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (Andrade *et al.*, 2000a; Andrade *et al.*, 2000b), *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (Nakaune *et al.*, 1998; Nakaune *et al.*, 2002), *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (DC.) Speer (Hu *et al.*, 2008), e *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey (Schnabel *et al.*, 2003).

A observação segundo a qual os transportadores ABC e MFS influenciam a sensibilidade do fungo aos fungicidas e são responsáveis por MDR, além de atuarem como fatores de virulência implica que estes transportadores constituem um alvo atrativo para controle químico (Ponte-Sucre, 2007). Neste contexto, inibidores dos transportadores ABC e MFS podem melhorar a eficácia do controle químico e reduzir a virulência de fungos fitopatogênicos. O número de transportadores ABC e MFS clonados de fungos filamentosos está aumentando rapidamente e os programas de sequenciamento genômico atuais irão fornecer uma quantidade ainda maior de dados com relação a sequências destes transportadores. Embora a função de algumas dessas proteínas já tenha sido elucidada, o papel da maioria dos transportadores é ainda baseado em especulações derivadas de dados de expressão e homologia de sequências. Informações adicionais, concernentes às características fenotípicas de mutantes obtidos por meio de inativação e, ou superexpressão do gene dos transportadores ABC e MFS, são certamente necessárias (Stergiopoulos *et al.*, 2002).

Em experimentos de clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a partir do genoma de *C. lindemuthianum*, foi encontrado um clone (denominado R7) que apresentou 82% de identidade com o gene que codifica o transportador *ABC1* de *M. grisea* (Oliveira, 2006). Nesse trabalho, o vetor pR7 foi utilizado como sonda para a triagem e sequenciamento parcial do gene, que codifica o transportador ABC (*abcC11*) de *C. lindemuthianum* a partir de um banco genômico, previamente, construído (Soares, 2007). Para verificar a importância do gene *abcC11* para a patogenicidade de *C. lindemuthianum* foi, também, construído um vetor de inativação (pSM1ABC) para ser usado em experimentos de transformação de *C. lindemuthianum*.

É Interessante o fato de *M. grisea* e *C. lindemuthianum* utilizarem estratégias similares de infecção de suas plantas hospedeiras. Para penetrar no tecido vegetal, estes dois microrganismos desenvolvem uma série de estruturas de infecção especializadas como apressório, peg de penetração e hifa de infecção (Oconnell *et al.*, 1985; Bailey *et al.*, 1992; Talbot, 1995). Além disso, eles são organismos hemibiotróficos. Após penetração na cutícula e parede celular das células da epiderme, há um crescimento biotrófico inicial por meio de hifas intracelulares primárias, que possibilitam aos protoplastos das células vegetais permanecerem intactos. Em seguida, são formadas hifas secundárias, que matam a célula hospedeira e se proliferam por crescimento necrotrófico (Heath *et al.*, 1990; Perfect *et al.*, 1999; Munch *et al.*, 2008; Ribot *et al.*, 2008).

Devido a esta grande semelhança entre os processos iniciais de infecção de suas plantas hospedeiras por *C. lindemuthianum* e *M. grisea*, possivelmente genes de patogenicidade similares sejam requeridos por estes dois microrganismos para que ocorra o estabelecimento da doença. Desta forma, assim como em *M. grisea*, um transportador ABC também pode ser necessário à patogenicidade de *C. lindemuthianum* (Oliveira, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos, condições de cultivo e estocagem

O isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* (cedido pelo prof. Everaldo Gonçalves de Barros do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Brasil-MG) foi utilizado como linhagem selvagem-controle e como linhagem receptora para obtenção de mutantes. O fungo foi cultivado e mantido em meio BDA a 22°C. Para obter uma grande quantidade de conídios para inóculo, o fungo foi repicado em um pedaço de vagem estéril fixado no fundo de um tubo de cultura por 10 mL de agar-água 1,5% e incubado a 22°C durante sete dias (Silva *et al.*, 2007). A suspensão de conídios foi preparada em água destilada estéril e filtrada em gaze estéril para remoção de fragmentos de micélio. Para estocagem a longo tempo, as culturas de *C. lindemuthianum* foram conservadas como uma suspensão, contendo 10⁷ conídios em glicerol 25% e armazenadas a -80°C em tubos Eppendorfs.

Células quimicamente competentes de *Escherichia coli* K12 DH5α (Inoue *et al.*, 1990) foram utilizadas nos experimentos de clonagem e subclonagem e na manutenção dos vetores. As bactérias foram cultivadas em meio LB a 37°C e seus estoques foram feitos em glicerol 40% a -80°C (Sambrook *et al.*, 1987).

3.2. Obtenção da sequência completa dos genes *abcC11* e *cypC11*

A partir dos fagos recombinantes isolados do banco genômico, bem como da sequência parcial do gene *abcC11* obtida previamente (Oliveira, 2006), o sequenciamento completo dos genes *abcC11* e *cypC11* foi realizado por meio da subclonagem do DNA dos fagos no vetor pBluescript II SK (Stratagene). Os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), necessários ao sequenciamento pelo método *primer walking*, foram desenhados utilizando-se o programa primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). A extração de DNA plasmidial foi realizada com o *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas).

Para o sequenciamento, utilizou-se o sistema *Big Dye Terminator* (Amersham Life Science) em um sequenciador ABI377 (Perkin-Elmer).

As sequências de DNA foram analisadas, montadas e editadas, utilizando-se os programas DNAMAN (Lynnon Corporation) e Chromas (Technelysium Pty Ltd) com o auxílio das ferramentas BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Para análise de domínios transmembrana, foi utilizado o programa TM Finder (Deber *et al.*, 2001). O alinhamento entre as sequências de aminoácidos foi realizado no programa CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007).

A sequência completa de nucleotídeos dos genes *abcC1* e *cypC1* foram depositadas no banco de dados do GenBank com o número de acesso FJ753577 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

3.3. Análises por hibridização

Para a extração de DNA total, conídios de *C. lindemuthianum* foram inoculados em placas de Petri contendo meio GPYECH (Parisot *et al.*, 2002), sendo as placas incubadas a 22°C durante 7 dias. Após a incubação, o micélio foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C.

A extração do DNA total de *C. lindemuthianum* foi feita, adotando-se o protocolo estabelecido para fungos do gênero *Aspergillus* (Prebble & Anderson, 1998) com adição de duas etapas de desproteínização, uma vez em fenol:clorofórmio e uma vez em clorofórmio.

O DNA total do fungo foi digerido com diferentes enzimas de restrição e fracionado por eletroforese em gel de agarose. Após o fracionamento por eletroforese, os fragmentos de DNA foram transferidos para membranas de náilon (Duralon-UV Membranes, Stratagene) pela ação da capilaridade em SSC 10X (Sambrook *et al.*, 1987). As membranas foram hibridizadas a 65°C, com sondas marcadas a frio com o Kit Amersham Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare). As reações de marcação bem como as condições de hibridização e detecção foram realizadas, seguindo as orientações do fabricante.

Como sonda, para a análise do número de cópias do gene *abcC1*, foi utilizado um fragmento de DNA de 1.573 pb interno ao gene (sonda 1), obtido com os oligonucleotídeos Coltr2 e Coltr3, a partir do vetor pABC-S. Para o gene *cypC1*, a sonda foi obtida pela amplificação de um fragmento de 2.258 pb (sonda 2), obtido com os oligonucleotídeos Coltr9 e T7, a partir do vetor pABC-X2 (Tabela1, Figura 2).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome	Sequência (5'-3')	Finalidade
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Sequenciamento
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenciamento e amplificação da sonda 2
Coltr1	AGAAACACCGCGAATGTAT	Sequenciamento
Coltr2	CGACGAGTTTGCTACTGCT	Sequenciamento e amplificação da sonda 1
Coltr3	CGGTAGTAGTTTGCAAGTGC	Sequenciamento e amplificação da sonda 1
Coltr4	GATCGTCTCCTCTTCTAGC	Sequenciamento
Coltr5	TCTTTACCAGAACGCCATC	Sequenciamento
Coltr6	AAGCTACCTTGTGCTGACTC	Sequenciamento
Coltr7F	TGAACAGCGACAAGATCGAC	Sequenciamento
Coltr8R	TTCGCTGGAGACCTCAGGTG	Sequenciamento
Coltr9	CCATTTGCGGTATTTAAGTC	Sequenciamento e amplificação da sonda 2
Coltr10	AGAAGGGTCCTCTAAACGTC	Sequenciamento
Coltr11	GAAATGCACACCAATCATCG	Sequenciamento
Coltr12	GTTGGAAGACTCGGTGGGTA	Sequenciamento
Coltr13	TAGAGTCGAGAGCTGTGGTG	Sequenciamento
Coltr14	CTCCTCGTCTGTACCTCCTT	Sequenciamento
Coltr15	TGTCAAACGTCGTGTAGTTG	Sequenciamento
CLABCq1	TCTTCGCCCTGCTCATGAAC	RT-PCR
CLABCq2	GGCGGACGGGTGGTAGA	RT-PCR
CL450q1	TCATTGGCGACTTGGCTTTC	RT-PCR
CL450q2	GTACCAACACGCGCCATCT	RT-PCR
CLGpDq1	CCGCACTGCTGCTCAGAAC	RT-PCR
CLGpDq2	GGACATGCCGGTGAGCTT	RT-PCR
CLrRNA1	TGAGTGGCACAAGCAAATAGTCA	RT-PCR
CLrRNA2	TGCAATTCACATTACTTATCGCATT	RT-PCR

Para a análise molecular dos transformantes de *C. lindemuthianum*, primeiramente, a membrana foi hibridizada com a sonda para o gene *abcC1* (sonda 1). Depois, a membrana foi lavada e hibridizada novamente, utilizando-se o vetor pBluescript II como sonda.

Em todas as análises por hibridização, para a retirada da primeira sonda, as membranas foram incubadas em uma solução de SDS 0,5% (P/V) durante 60 minutos a 70 °C e depois lavadas em Tris-HCl pH 8,0 100 mM por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.4. Inativação do gene *abcC1*

A inativação do gene *abcC1* de *C. lindemuthianum* foi realizada por meio da integração e interrupção do gene por um plasmídeo. Utilizou-se o plasmídeo pSM1ABC (Figura 1), construído previamente (Oliveira, 2006) por meio da ligação de um fragmento interno do gene *abcC1* de 2.695 pb nos sítios *KpnI/HindIII* do vetor pSM1 (Poggeler *et al.*, 2003). Assim, a integração do vetor pSM1ABC no genoma do fungo foi direcionada ao locus do gene *abcC1* via recombinação homóloga.

Para a transformação de *C. lindemuthianum* com o vetor pSM1ABC, adotou-se um procedimento modificado de métodos previamente publicados (Rodriguez & Yoder, 1987; Redman & Rodriguez, 1994). Uma suspensão contendo 10^8 conídios foi inoculada em um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio GPYECH, sendo o Erlenmeyer incubado a 22°C sob agitação de 150 rpm durante 7 dias. Após o crescimento do fungo, o micélio foi filtrado em gaze estéril e lavado em solução tampão (tampão fosfato pH 5,8 10 mM, KCl 0,8 M). Três gramas de micélio foram transferidas para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do tampão adicionado com 7 mg/mL de Lysing Enzyme (Sigma) e 15 mg/mL de BSA. A protoplastização foi feita a 30°C sob agitação de 80 rpm durante 3-4 horas. Os protoplastos foram filtrados em gaze estéril e lavados duas vezes em ST (Sorbitol 1 M, Tris-HCl pH 7,5 100 mM) e uma vez em STC (Sorbitol 1 M, Tris-HCl pH 7,5 100 mM, CaCl_2 50 mM) por meio de centrifugações sucessivas a 3000 g a 4°C durante 10 minutos e ressuspensão dos protoplastos em 5 mL dessas soluções. Após as lavagens, os protoplastos foram centrifugados a 3000 g a 4°C durante 10 minutos e ressuspensos em STC, para obter uma concentração final de 10^7 protoplastos/mL.

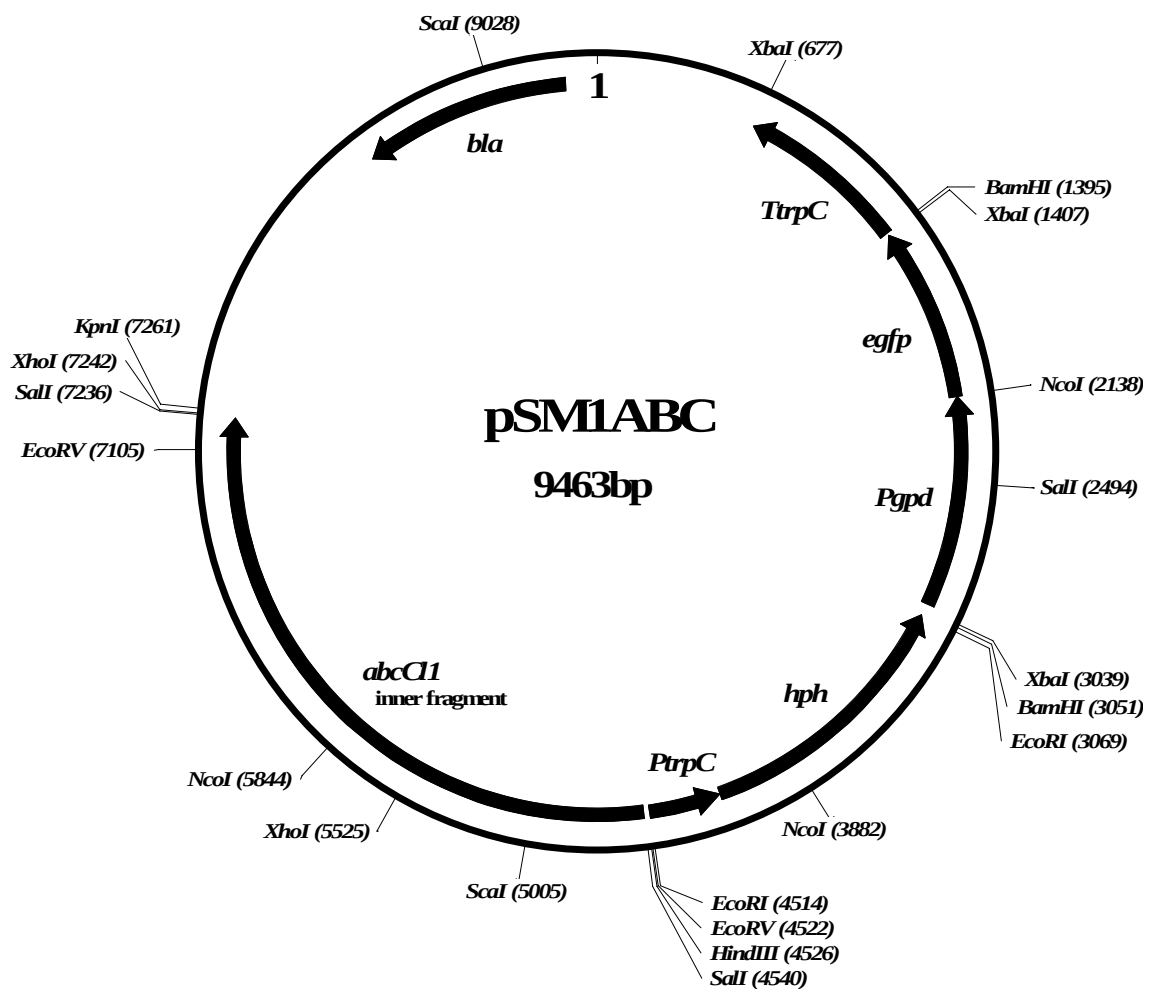


Figura 1 – Representação esquemática do vetor pSM1ABC usado para a transformação. A posição dos sítios de restrição foi indicada.

Duzentos microlitros da suspensão de protoplastos (10^7 protoplastos/mL) foram misturados com 10 µg do vetor pSM1ABC e 50 µL de solução de polietilenoglicol (PEG 6000 25%, CaCl_2 50 mM) e incubados a 0°C durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução de PEG ao tubo da transformação e este foi incubado durante 20 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo do tubo da transformação foi dividido em cinco partes, sendo cada parte plaqueada em meio BDA contendo estabilizador osmótico (sacarose 0,56 M). As placas foram incubadas a 22°C durante 24 horas. Após regeneração dos protoplastos, 5 mL de meio BDA semi-sólido contendo higromicina (Sigma-Aldrich) foram adicionados sobre o meio de cultura de cada placa da transformação, sendo que a concentração final de higromicina na placa foi 60 µg/mL. As placas foram incubadas, novamente, a 22°C até o aparecimento das colônias dos transformantes.

Os transformantes resistentes à higromicina foram, posteriormente, purificados por meio de isolamento monospórico.

3.5. Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade do isolado selvagem e dos transformantes de *C. lindemuthianum* foi realizado, de acordo com um método previamente publicado (Dufresne *et al.*, 1998). Plantas de *P. vulgaris*, cultivar Rosinha, que é altamente susceptível à antracnose, foram crescidas por 8 dias em casa de vegetação. Folhas primárias foram excisadas e colocadas em placas de Petri, contendo discos de filtro de papel embebidos em água. A superfície abaxial da folha foi inoculada com uma suspensão de 10^6 esporos/mL dos transformantes ou selvagem. As placas de Petri foram incubadas a 22°C em câmara de luz com 8h de escuro e 16h de luz ($166 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). Os sintomas foram observados 7 a 11 dias após a inoculação. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, a inoculação foi realizada em triplicata.

3.6. Análise da expressão relativa dos genes *abcC1* e *cypC1*

Conídios de *C. lindemuthianum* selvagem foram inoculados em Erlenmeyers, contendo 100 mL de meio GPYEC e incubados a 22°C sob agitação. Após seu crescimento, o micélio foi transferido assepticamente para

um novo meio GPYECH (50 mL) na presença ou ausência de compostos tóxicos, onde permaneceu durante 8 horas (Semighini *et al.*, 2002). Os seguintes compostos tóxicos foram utilizados: eugenol 0,01% (Sigma-Aldrich), higromicina 10 µg/mL (Sigma-Aldrich), psoralen 10-20 µg/mL (Sigma-Aldrich), camptotecina 10-20 µg/mL (Sigma-Aldrich) e pisatina 10 µg/mL (gentilmente cedida pelo professor Hans VanEtten, Department of Plant Science, University of Arizona). O eugenol foi adicionado puro à cultura, enquanto os outros compostos foram adicionados a partir de soluções-estoque na concentração de 10 mg/mL, preparadas em água (higromicina) ou DMSO (psoralen e camptotecina), ou de 2 mg/mL em etanol (pisatina). Para avaliar o efeito dos solventes na expressão gênica, o fungo também foi cultivado durante 8 horas na presença de DMSO (100 µL) e de DMSO mais etanol (50 µL e 250 µL, respectivamente). Após o tempo de incubação, o micélio foi filtrado e lavado em água destilada, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C. Os micélios foram obtidos em duplicatas independentes, para cada condição avaliada.

Para a extração de RNA total, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido e o RNA foi isolado, utilizando-se o TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), conforme recomendações do fabricante. Depois de extraído, o RNA total foi submetido a um tratamento com DNase RNase-free (Promega). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260 nm. A qualidade do RNA foi avaliada, conforme integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,0%. A pureza foi determinada pela razão das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

As amostras de RNA foram submetidas à análise quantitativa de expressão gênica por meio da PCR em tempo real. Um micrograma do RNA total foi utilizado, para sintetizar a primeira fita de cDNA por meio do Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para a amplificação de um fragmento de 113 pb e 100 pb dos genes *abcC1* (CLABCq1 e CLABCq2) e *cypC1* (CL450q1 e CL450q2), respectivamente. Como controle interno, para a normalização dos valores de expressão gênica, foram utilizados os oligonucleotídeos CLrRNA1 e CLrRNA2 (que amplificam um fragmento de 100 pb do rRNA de *C. lindemuthianum*, número de acesso: EU400134.1) e os oligonucleotídeos CLGpDq1 e CLGpDq2 (que amplificam um fragmento de 100 pb do gene da

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *C. lindemuthianum*, número de acesso: AF000310). Os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 1) foram desenhados, utilizando-se o programa Primer Express (Applied Biosystems). Como calibrador, foi utilizado o controle sem tratamento, ou seja, a amplificação de *abcC11* ou *cypC11* a partir do cDNA do micélio crescido na ausência de drogas ou na presença de solventes.

As reações foram realizadas num volume de 25 µL contendo 1X da preparação SYBR® Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems), cada oligonucleotídeo na concentração de 0,2 µM, e 1 µL do cDNA. Todas as amostras foram amplificadas em triplicata com o programa: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 1 s e 60°C por 1 min. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. Os produtos foram desnaturados a 95°C por 15 s e reanelados a 60°C por 1 min; após esse tempo, os dados da curva de desnaturação foram coletados por meio do incremento de 0,35°C até atingir a temperatura de 95°C. As leituras foram realizadas em um equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Os dados da expressão relativa foram analisados, conforme o método da curva-padrão (Applied Biosystems User Bulletin #2 – P/N 4303859). As curvas-padrões foram preparadas para cada conjunto de oligonucleotídeos, usando-se diluições seriadas 1:10 dos cDNAs. A expressão relativa dos genes-alvo (*abcC11* e *cypC11*) foi calculada, dividindo-se a quantidade normalizada de mRNA para cada condição teste pela quantidade normalizada de mRNA do calibrador.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização dos genes *abcC11* e *cypC11*

Na tentativa de encontrar elementos transponíveis no genoma de *C. lindemuthianum*, trinta diferentes fragmentos de DNA (R1-30), obtidos por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), foram clonados e sequenciados (Oliveira, 2006). Nas análises por BLASTX das sequências de DNA obtidas, um clone (denominado R7) destacou-se por apresentar alta identidade com o transportador Abc1 de *M. grisea*. Assim, o vetor pR7 foi utilizado como sonda para a triagem do gene, que codifica o transportador ABC (*abcC11*) de *C. lindemuthianum* a partir de um banco genômico, previamente construído no fago lambda EMLB3 (Stratagene) (Soares, 2007). Nessa triagem do banco genômico foram isolados cinco clones diferentes (F1, F2, F3, F4 e F5), apresentando homologia com o gene *abcC11* (Oliveira, 2006).

No presente estudo, o fragmento de DNA genômico de *C. lindemuthianum* presente no clone F3 foi subclonado no vetor pBluescript II SK (Stratagene) dando origem aos vetores: pABC-S, pABC-X2, pABC-X3, pABC-K e pK9 (Figura 2). Com o sequenciamento destes plasmídeos, obteve-se uma sequência contendo 8.403 pb do genoma de *C. lindemuthianum*. A análise dessa região genômica pelo programa BLASTX revelou a presença de um agrupamento contendo dois genes, que possivelmente estão envolvidos na resistência de *C. lindemuthianum* a compostos tóxicos. Esses genes foram denominados *abcC11* e *cypC11*; eles codificam um transportador ABC e um citocromo P450, respectivamente.

Os genes *abcC11* e *cypC11* estão orientados de forma invertida um em relação ao outro (Figura 2). A janela aberta de leitura (ORF – *Open reading frame*) do gene *abcC11* codifica uma proteína contendo 1459 aminoácidos e está, possivelmente, interrompida por dois íntrons, sendo um de 129 pb e o outro de 49 pb. Quanto ao gene *cypC11*, codifica uma proteína de 497 aminoácidos e sua sequência genômica está interrompida por quatro prováveis íntrons com tamanhos de 70, 56, 58 e 53 pb. Os sítios de *splicing* 5' GT e 3' AG, preditos para os íntrons encontrados na sequência genômica, estão de

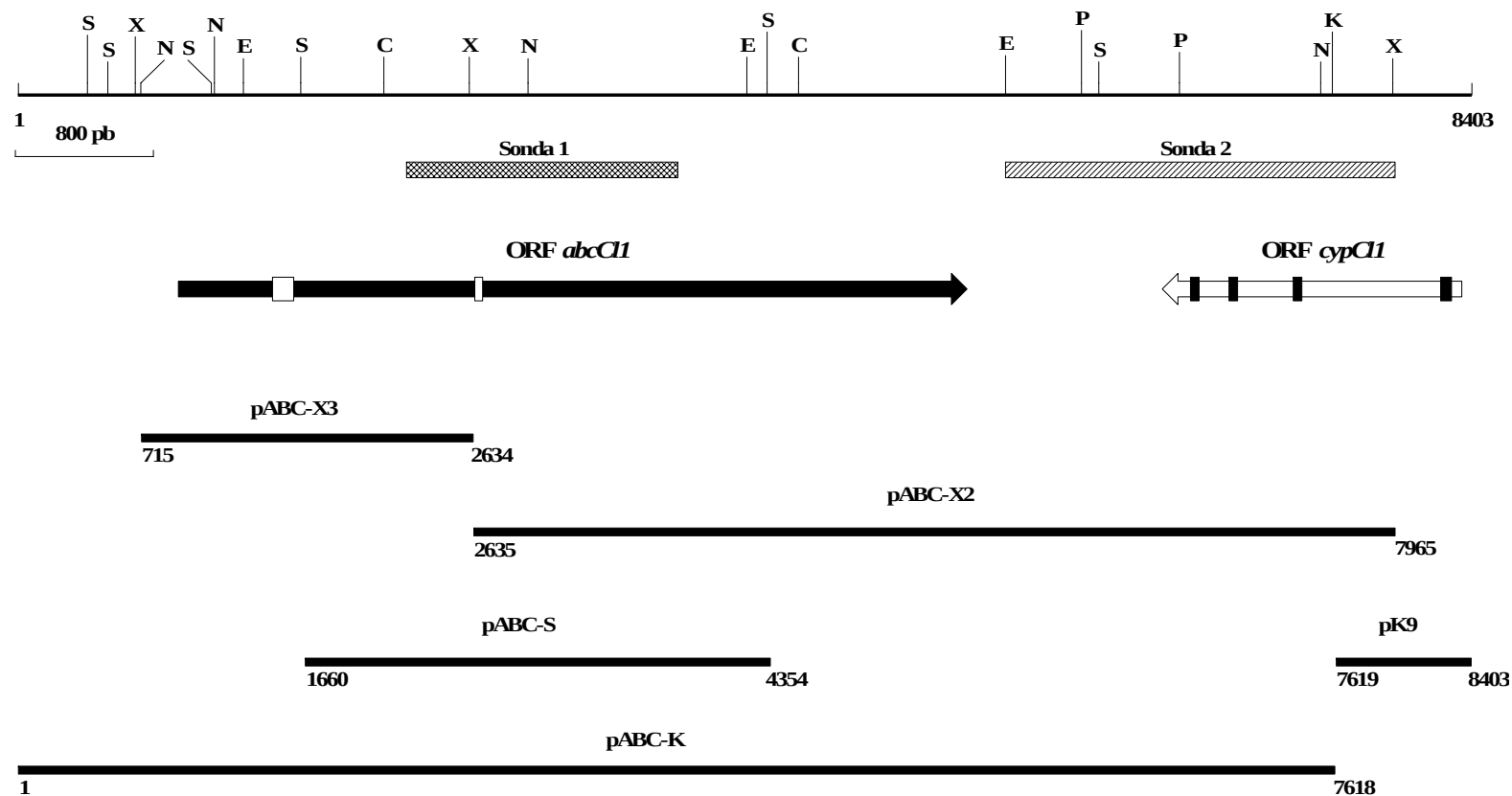


Figura 2 – Representação esquemática do *cluster* genômico, onde estão presentes os genes *abcC11* e *cypC11*. No topo, está o mapa de restrição da sequência, a posição de anelamento das sondas 1 e 2 e a posição das ORFs dos genes *abcC11* (seta preta) e *cypC11* (seta branca). As caixas, interrompendo as ORFs, representam os íntrons. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição são S, *Sall*; X, *XhoI*; N, *NcoI*; E, *EcoRV*; P, *SphI*; K, *KpnI*; C, *Scal*. Abaixo estão representados os fragmentos de DNA, que foram subclonados para dar origem aos vetores pABC-S, pABC-X2, pABC-X3, pABC-K e pK9.

acordo com sequências típicas de íntrons, observados em fungos (Kinghorn & Turner, 1992).

Na região flangeadora 5' de *abcC1/1* (929 pb) foi identificado um motivo CAAT na posição -370 (Kinghorn & Turner, 1992). Um sequência consenso 5'-GCCA^A/G-3' (Tilburn *et al.*, 1995), de reconhecimento do fator transcricional PacC, foi, também, identificada na posição -662 (Figura 3). A proteína PacC controla a transcrição de genes regulados por pH. Em *C. lindemuthianum*, o gene *pacC* codifica um fator transcricional cuja ativação, durante o processo de colonização do hospedeiro, possivelmente ativa a transcrição de genes de patogenicidade necessários ao crescimento necrotrófico deste fungo (Soares, 2007).

A análise da sequência protéica, deduzida do gene *abcC1/1*, revelou que o transportador ABC de *C. lindemuthianum* contém dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBF: *Nucleotide-Binding Fold*) e duas regiões prevalentemente hidrofóbicas, cada uma contendo seis domínios transmembrana (TMD₆: *six Trans-Membrane Domains*). Estes domínios estão organizados numa topologia (NBF-TMD₆)₂. Os domínios transmembrana, identificados com o programa TM Finder (Deber *et al.*, 2001), compreendem os resíduos de aminoácidos localizados nas posições 482-496, 508-533, 568-580, 586-607, 621-641 e 732-750 no N-terminal, e 1154-1170, 1182-1201, 1223-1246, 1273-1295, 1305-1316 e 1424-1442 na extremidade C-terminal da proteína. O alinhamento com transportadores ABC de outros fungos mostrou que a proteína ABCC11 possui, tanto no NBF N-terminal quanto no NBF C-terminal, os motivos conservados Walker A e Walker B, bem como a assinatura ABC (Figura 4).

Na análise por BLASTP com a sequência de aminoácidos deduzida do gene *cypC1/1*, foi observada uma identidade de 53% com uma monoxigenase dependente de citocromo P450 putativa de *Talaromyces stipitatus* (número de acesso EED22142) e de *Aspergillus flavus* (número de acesso EED47461). Utilizando o programa SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), uma sequência peptídeo sinal foi encontrada na extremidade N-terminal da proteína deduzida (Figura 5) indicando; assim, um provável endereçamento de CYP11 para o retículo endoplasmático, como ocorre com a maioria dos citocromos P450 encontrados em fungos (van den Brink *et al.*, 1998). No alinhamento com citocromos P450 de outros fungos, duas regiões mais conservadas foram

```

-929      ACGATCCTTTCTTTGCTCTTGAAGCTGAGGAGAAGTTGGATGAGGTTGCGACGCTCTGGT
-869      TGTCATCAATAGAAAGCAGAATGGAAACATGGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATAAT
-809      TAAATATTCAAATATCCAATTCCGCTGTTCTTGTTCCTCCGAACATGCCCCCTCTGGGCCAT
-749      CTCATTTACCTGCCCTGGCTCTATTCCACGCCACACCCCGTCCCATATTTTGTCTCTCC
               - PacC box -
-689      CCCAGTGCAGCCCATAGCCCTGGACTAGGCCAGGGTACGTGCTAAAGCTGCATATCCTTGT
-629      CCTTGTCTGGCTGGCGGTCCTGGTCCGCCCAAGCTGCTGGGATCTTCTATTTTTTTATTC
-569      TCGCAGACCTCCCATGCTTACTTCTACCTCCCATCCCCTTCGCCTGGCCTGGCTCGAACG
-509      TTTGTCGACGACTTCCTTCGCCCTCTATACCTTAGTCCCTTTTCTTGTAATTCCTCTTCG
-449      CGTCGGTCCTTAATTCCCTACATCTGCAACGTTGTCTCGCCCAAGAGGTCGACATCTAGTA
               - CAAT box -
-389      CCTAATCTCTACAAGCAGACCCAAATATTGGTCCACGCCGCTCGAAGATAGCCGAACATCG
-329      AGGAGAAGAAGTCATATCAGCGCCGATCAGGTGGTCCTTGTACGCCTGTATCCGCTATCG
-269      GCTCCGTCTGACATAGAGCAACCTTTCTCGGCTGTTGGTTGGGACTCGGTTCCCTCGAGG
-209      TCGATTGCGACCATGGCTTTTCGCCGGGATGGCTTCCGTCCCCAACTACGACAGCACGGCC
-149      CAGACGTCCGGGAGTCCCCATCAGCTCTGGTCGTACAGTGCCGTCACGAGGAGGAGGACA
-89      CTTGCCGCCGCCAACCAGAACACCGTCTGACACAGCTGCCACCTCGTGTACCTGAGGTC
-29      TCCAGCGAAAAAAGCCCTCCATCCGCCCATGAACAGCGACAAGATCGACTCTGCCGAGG
               M N S D K I D S A E

```

Figura 3 – Sequencia de nucleotídeos da região flankedora 5' do gene *abcC11* de *C. lindemuthianum*. Os nucleotídeos foram numerados (à esquerda) a partir da primeira base (+1) do códon de iniciação da tradução. Os motivos de reconhecimento para fatores transcripcionais foram destacados em negrito.

N-terminal				
Organismo	Acesso	Walker A	Assinatura ABC	Walker B
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	FJ753577	GEMLVVLGPPGSGCSTFLK	GVSGGERKRVITIAEAALSGAPLQCWDNSTRGLD	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_752803	GEMLVVLGRPGSGCSTFLK	GVSGGERKRVIAEATLSGSPQLCWDNSTRGLD	
<i>Penicillium digitatum</i>	BAA31254	GEMLIVLGRPGSGCSTFLK	GVSGGERKRVIAEATLCGSPQLCWDNSTRGLD	
<i>Penicillium digitatum</i>	BAD42437	GETLVVLGKPGSGCSTLLK	GVSGGERKRVIAEATLSQSPLQCWDNSTRGLD	
<i>Magnaporthe grisea</i>	AAB86640	GEMLVVLGPPGSGCSTFLK	GVSGGERKRVITIAEAALSGAPLQCWDNSTRGLD	
<i>Neurospora crassa</i>	XP_960553	GEMLVVLGPPGSGCTTFLK	GVSGGERKRVIAEAALSGAPLQCWDNSTRGLD	
<i>Gibberella pulicaris</i>	CAC40023	GEMLVVLGPPGSGCSTFLK	GVSGGERKRVITIAEATLSNAPFQCWDNSTRGLD	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAC41639	GEMLVVLGRPGSGCSTLLK	GVSGGERKRVIAEAAVGGSPLQCWDNSTRGLD	
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	ABN41482	GEMLLVLGQPGSGCSTLLK	GVSGGEVKRVIAEAAVARSAIQCWDNSTRGLD	
<i>Monilinia fructicola</i>	AAL80009	GEMLLVLGRPGAGCTTLLK	GVSGGERKRVSIETLATRGSMCWDNSTRGLD	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAB52402	GEMLLVLGRPGAGCTTLLK	GVSGGERKRVSIEMLASRGSMCWDNSTRGLD	
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	AAK62340	GEMLLVLGRPGAGCTSLLK	GVSGGERKRVSIETMAARATVVCWDNSTRGLD	
		** *:*** *:***::**	***** *:*** * .. *****	
C-terminal				
Organismo	Acesso	Walker A	Assinatura ABC	Walker B
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	FJ753577	GTLTALMGVSGAGKTTLLDCL	GLNVEQRKRLTIGVELVAKPPLLLFVDEPTSGLD	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_752803	GTCTALMGVSGAGKTTLLDVL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPQLLLFLDEPTSGLD	
<i>Penicillium digitatum</i>	BAA31254	GTCTALMGVSGAGKTTLLDVL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPQLLLFLDEPTSGLD	
<i>Penicillium digitatum</i>	BAD42437	GTCTALMGVSGAGKTTLLDVL	GLNVEQRKRLMIGVELAAKPQLLLFLDEPTSGLD	
<i>Magnaporthe grisea</i>	AAB86640	GTLTALMGVSGAGKTTLLDCL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPPLLLFVDEPTSGLD	
<i>Neurospora crassa</i>	XP_960553	GTLTALMGVSGAGKTTLLDCL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPPLLLFVDEPTSGLD	
<i>Gibberella pulicaris</i>	CAC40023	GTLTALMGVSGAGKTTLLDCL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPPLLLFVDEPTSGLD	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAC41639	GTLTALMGVSGAGKTTLLDVL	GLNVEQRKRLTIGVELAAKPALLFLDEPTSGLD	
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	ABN41482	GTLTALMGVSGAGKTTLLDVL	GLNVEQRKRLTIAVELVAKPAVLLFLDEPTSGLD	
<i>Monilinia fructicola</i>	AAL80009	GMLGALMGSSGAGKTTLLDVL	GLSIEQRKRLTIGVELVSKPSILIFLDEPTSGLD	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAB52402	GMLGALMGSSGAGKTTLLDVL	GLSVEQRKRLTIGVELVSKPSILIFLDEPTSGLD	
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	AAK62340	GMLGALMGSSGAGKTTLLDVL	GLSVEQRKRLTIGVELVSKPSILIFLDEPTSGLD	
		* ***** *	** :***** *:*** :* :* :*****	

Figura 4 – Alinhamento entre a sequência de aminoácidos deduzida do gene *abcC1* com o domínio de ligação ao ATP de transportadores ABC de outros fungos, destacando-se os motivos conservados Walker A, Walker B e a assinatura ABC. Aminoácidos idênticos foram marcados com asteriscos.

Fungo^a Acesso

Cl	FJ753577	-----MAILT--FGLVNTVGLAVGL-LFAYTFGIFFYNLYLHPLRKYPGPLLMRGTRLPFCYKLLTGTLPYDVLDLHRKYGEAVRIGPDELAF	85
Nf	XP_001262654	-----MHQRYGDIVRVAPDELFF	
Ag	XP_746900	-----MHQRYGDIVRVAPDELFF	
Ts	EED22142	-----MLDQINLLD--AKLAFLLAISMAI-LYP-IAQ-AIYNVYFHPLSRFPGPISHAISRLPYFYCQINGTLVFDMLTLHQRYGDIVRIAPDELAF	
Af	EED47461	-----MMLNSINIPQ--NAISWAVACAAAA-TFC-LASSVVYNIFFHPLARYPGPLSHAASRVPYFIRVFKGTLPFDMLDFHTRYGDVVRIPDELAF	
Ac	XP_001275759	MTSMSHLLLEPLSMVCGIILLVSPSLAFAVKTLAVPVAQSLYNIYFHPLRRFPGPKRASCNSVCYLWTVSGTIHWKLKELHDQYGEVVRISPSILVY	
Fa	AAM48921	-----MFQYSLWPLLALSGGTAVAYFVIMLVYNLFFHPLRNYPGPWLNTMTQIPHTLLMLCGLPHKRHLALHMKYGPVVRIGPNMLSF	
Fm	AAM48905	-----MFQYSLWPLLALSGGTAVAYFVIMLVYNLFFHPLRNYPGPWLNTMTQIPHTLLMLCGLPHKRHLALHMKYGPVVRIGPNMLSF	
Gz	AAM48913	-----MFQYSLWPLLALSGGTAVAYFVIMLVYNLFFHPLRNYPGPWLNTMTQIPHTLLMLCGLPHKRHLALHMKYGPVVRIGPNMLSF	
Gz	BAD98712	----MSVLSILLDGEVIHPVLLPLVAVA--MLVYTLFWAIYNLFFHPLSKFPGPRLWAISTIPYIRNFTAGKCHFTILEMHKKYGPVVRIGPNLDSL	
		: * : ** ** : . * *	
Cl	FJ753577	HDSRAWRDIMGHRTAGGLEMEKSEKFYRAVPRAASDIVNSGREEHSALRRSLAHGFSERTLRDQQPIIKRYIDLLIQRLHEHCDNGA-EALDLAAWYNYT	184
Nf	XP_001262654	AHPDAWSDIH--KKTGKAMDKARWFYRPLEVTPRSIVDESHERHSRLRRQMAAGFSEKSMRDQEPIIRGYVDLLLQRLREKSNDGQ--PVVISDWFNYT	
Ag	XP_746900	AHPDAWSDIH--KKTGREMDKAPWFYRPLEQSPRCIVDESHEQHSRLRRQMAPGFSEKSMRDQEPIIRGYVDLLLQRLLEKSNDGQ--PVVISDWFNYT	
Ts	EED22142	SHPDAWKDIMGH-KNGEAEKASWYYRPIE-EPPHIVNEEQERHRSRLRRQMAHGFSEKSMRDQEPIIRKYVDLLVDKLRQQSNSLEGSPIVLSDWYNYT	
Af	EED47461	SHPDAWKDIMGH-SKGGLYLEKASWYRPLEYDPPHIFNEGRQAHSLLRRQLAHSFSDKGMRDQEPIMIRGYVDLLLQRLREMGGRED--TVDISAWYNYT	
Ac	XP_001275759	RSPNAWRDIYGHRKHDTTSFVKDPDYYIPSP-NGEHILTANDADHARERRLLSHAFSERALREQESIVQQYVNSLILKLQEYAASGS--AVDMAKWYNYT	
Fa	AAM48921	NHPDAMKDVGRHRSKGEAEHGKDP--IIVLSNGDNIVGSDRENHTRFRRALAYGFSQAAMLEQEPTFKAYVNQLFQRLHEQSSNGT-KTVDISKWYTF	
Fm	AAM48905	NHPDAMKDVGRHRSKGEAEHGKDP--IIVLSNGDNIVGSDRENHTRFRRALAYGFSQAAMLEQEPTFKAYVNQLFQRLHEQSSNGT-KTVDISKWYTF	
Gz	AAM48913	NHPDAMKDVGRHRSKGEAEHGKDP--IIVLSNGDNIVGSDRENHTRFRRALAYGFSQAAMLEQEPTFKAYVNQLFQRLHEQSSNGT-KTVDISKWYTF	
Gz	BAD98712	NHPDGMKALRGHRKSGTGENSKEP--ISTSPSADNIIGANRENHQYRRSLAHGFSQHSMMAQQPIIRAYVDKLMNGLRAVCENG-KPVNIAAWYNYT	
		. . : . *	
		* . * ** : . ** : : * . : : * : : *	
		. : : : * : : *	

Figura 5 – Alinhamento entre a sequência de aminoácidos deduzida do gene *cypC11* com citocromos P450 de outros fungos. As duas regiões mais conservadas, possivelmente, envolvidas com a ligação ao grupo prostético heme foram destacadas em cinza. O resíduo de cisteína absolutamente conservado foi indicado por um triângulo preto. A sequência de um provável peptídeo sinal foi sublinhada. Aminoácidos idênticos foram marcados com asteriscos.

Fungo^a Acesso

Cl	FJ753577	TFDIIGDLAFGEAFGCLDGS DYHPWVR SIFQMARVGT VLTATFY PFVLTLMAMVPAKVKREREHHEELTAAKLKRRIELGQERPD LIEGL LKKKDDWN	284
Nf	XP_001262654	TFDIIGDLAFGE PFEC LKSSKYHG WIRSV FESSRPLAVVQAL SFFPWLKRIVLDMVPKDLQETFKRQQRHTEAKMRRRMAVTGNRV DLM EGL LKKKDEFN	
Ag	XP_746900	TFDIIGDLVFGEPFEC LGSSKYDGWIKSIFESLRPLTIVQAL SFFPWLKRIALDTPKNLQGD IKQQQQTEAKMRRRMAVTASRGD LMEGL LKKKDELH	
Ts	EED22142	TFDIIGDLAFGE PFGCLQGSHYDNWIESIFDLAYIGSILQALS FYPWLKRGLLALVPRSARDAYEKHKKLTEAKMRRRMAVTEERPDLIEGL LKKKDELN	
Af	EED47461	TFDIIGDLSFGESFGCLKGSNYDEWIESIFRAFPFITALQALSFTPLVKEVLLALVPPSMRDRRERL RDFTRQKMLRRMAIAEERPDLIEGL LKKKEELG	
Ac	XP_001275759	TFDIIGDLAFGE PFDCLRDNRYHPWWMIFQSAKASVFMRL LHL YPRLES LVKKMLPKKFVRMRNEHWQMSKEKVGRRLSLQANRPDFMSYILKYDERG	
Fa	AAM48921	TFDMIGDLAFGESFGCLDNSTYHPWVALAFESLKSLAFMAEMGRYPRIAPYIGFLLPKGLLNKFAENKELASMKVRKRLDTETDRPDFVGKITQGLKAKG	
Fm	AAM48905	TFDMIGDLAFGESFGCLDNSTYHPWVALAFESLKSLAFMAEMGRYPRIAPYIGFLLPKGLLNKFAENKELASMKVRKRLDTETDRPDFVGKITQGLKAKG	
Gz	AAM48913	TFDMIGDLAFGESFGCLDNSTYHPWVALAFESLKSLAFMAEMGRYPRIAPYIGFLLPRGLLNKFAENKELASMKVRKRLDTETDRPDFVGKITQGLKAKG	
Gz	BAD98712	TFDIIGDLAFGE PFGCLDTGKLHPWITLMFSSIKELAF TT SIARTPWLNNLWKL VTPKQSMNQWATHMETAREKVRKRLASEKKRPDFIDAMLERTGAAG	
		: * * . . * : *	
		* :	
		*	
		:	
		* : * :	
		. * * : :	
		: :	
Cl	FJ753577	--MTFEKLKANSSILIIGGSETTATLLSGVTYLLLMNPELRKLTEEIRSAFKNENEIGFTSVSNLPYLLACLEEALRMYPVPVIG-LPRIVPKGGANIA	381
Nf	XP_001262654	--LSIDELITNAQVLILAGSETTASLLSGVIYLLQLNSVAYQQLVDEVRSTFSSEKEINFVSASQLSYMLACLNEALRMYPVANG-LPRVVPKGGAQIL	
Ag	XP_746900	--LSTEELIGNAQVLILAGSETTASLLSGVIYLLQLNAVAYRQLVDEVRSTFNSEKDINFVSQSLSYMLACLNEALRIYPPVANG-LPRVVPKGGAQIL	
Ts	EED22142	--LDIEHLVSNAEILIIGGSETTATLLSGVTYLILQDAKAYEKLKDEVSTFHSREDINLISVNSLPYMLACLDEALRMYPVANG-PPRVCPKGGARIL	
Af	EED47461	--LTIDKLTANAETLVAGSETTATLLSGVTYLLKNPEAYQRLREEVRSTFSEDDINLSSAAKLPYMLACVEEALRMYPVGAIG-PPRVTPKGGAEIL	
Ac	XP_001275759	--MSRQEIEANAGVLILAGSETTATALSGCTFYVLKNPEVYNRLVREIRTSFQRQEDITFLSVARLPYLHAALEESLRLYPPVPGI-LPRKVPAGGASVD	
Fa	AAM48921	SSMEFSELASNASVLIVAGSETTATLLSAAVYFLCSNPRTLELLTEEVRSTYTQADAIDL VSTQGLRYMQAVLDEALRMYPVAGGGS PRKI AKGGSVVA	
Fm	AAM48905	SSMEFSELASNASVLIVAGSETTATLLSAAVYFLCSNPRTLELLTEEVRSTYTQADAIDL VSTQGLRYMQAVLDEALRMYPVAGGGS PRKI AKGGSFVA	
Gz	AAM48913	SSMEFSELASNASVLIVAGSETTATLLSAAVYFLCSNPRTLELLTEEVRSTYAQADAIDL VSTQGLRYMQAVLDEALRMYPVAGGGS PRKI AKGGSFVA	
Gz	BAD98712	NQMTFEELASNAQVLILAGSETTATVLTATTYFLASN PETLKKVVKEVRSGFDSENEIDMHSV NKLTYMLACLNEGMRIFPPVING-TMRQIRPEGDDII	
		: ..: * : * : : * : : * : : : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura 5 (Continuação)

Fungo^a Acesso

Ci	FJ753577	DHYVPEGTTVSQYQWAMYNSEKNFKDPRNYHPERWL - DPAFASDNKEAFQPFHIGPRNCIGRNLAYLEMRIIVARMLFNDFMIRIANDSLDWMGRQKIY	479
Nf	XP_001262654	GQYIPEQTYVAIPQWALYHRKEYFAEPMDFHPERFLG - DSRFANDRRDALQPFSVGPRNCLGRNLAYAEMLRILALIIFNFDMKIDPDCRDWIQ - QKNF	
Ag	XP_746900	GQYIPEQTYVAIPQWALYHREYQFAEPNDFHPERFLG - DPKFANDRRDALQPFSVGPRNCLGRNLAYAEMLRILALVIFHFDMKIDPDCRDWIQ - QRNF	
Ts	EED22142	GEYIPENTYASIIHHWAMYRREEYFTDPDTHPERFLG - DSRFSNDQREAFQPFHLGPRNCLGRNLAYSEIRLILALIIFNFDMTLADESHDWIQ - QRNY	
Af	EED47461	GARIPGRTYVSIHHWALYRREEYFTDPHTFHPERFLG - DPRFSNDRHNVLQPFHIGPRSCLGRNLAYSEMRLILALLFFNFDMELSDDSQDWIQ - QKIV	
Ac	XP_001275759	GQYVPGGTVSTASFSAARAKSNFADPDSFIPERWLKNRDPKFESDNREASQAFSLGPRNCLGKNLAYAEMRVIIAKLLWNFDLSLHSDCYDWDN - QASF	
Fa	AAM48921	GYFVPENTLVENDMWAMHYDPKYFTQPHDFIPERWL - DARFNSDRDLDAVKPFSIGPRNCIGMNLAYAEMRMMLARTVWEFDIRLAESSRNWYQDSRVY	
Fm	AAM48905	GYFVPENTLVENDMWAMHYDPKYFTQPHDFIPERWL - DARFNSDRDLDAVKPFSIGPRNCIGMNLAYAEMRMMLARTVWEFDIRLAESSRNWYQDSRVY	
Gz	AAM48913	GYFVPENTLVENDMWAMHYDPKYFTQPHDFIPERWL - DARFNSDRDLDAVKPFSIGPRNCIGMNLAYAEMRMMLARTVWEFDIRLAESSRNWYQDSRVY	
Gz	BAD98712	GHIYPGGATVDVWQWAVHNNPDHFAADQYVPERWLENNDPRFANDAKQALNPFSLGPRDCIGKNLAYAEMRMILARVLWNFDISLHPDTPGWCKRTKSY	
		. : * . : : . * . : *** * * * * . : : * : * * * * * * * * * * : : * * : . . *	

Cl	FJ753577	LLWEKGPLNVHLLTPAKRS-----	497
Nf	XP_001262654	TLWQKPPCLKVYLKPVARKSEP---	
Ag	XP_746900	TLWQKPPCLKVYLKPVARKSEPQV	
Ts	EED22142	LTWKKPPLKVVYLTPRNEEA-----	
Af	EED47461	IMWQRGPLKVVHLYIHRNSA----	
Ac	XP_001275759	IIWQKPALMVDLKPARG-----	
Fa	AAM48921	LAWNKPPLNVYLSPR-----	
Fm	AAM48905	LAWNKPPLNVYLSPR-----	
Gz	AAM48913	LAWNKPPLNVYLDPR-----	
Gz	BAD98712	FLWERGAMDVMLTPRNT-----	
		* : : * *	

^aCl = *Colletotrichum lindemuthianum*
 Nf = *Neosartorya fischeri*
 Ag = *Aspergillus fumigatus*
 Ts = *Talaromyces stipitatus*
 Af = *Aspergillus flavus*
 Ac = *Aspergillus clavatus*
 Fa = *Fusarium austroamericanum*
 Fm = *Fusarium meridionale*
 Gz = *Gibberella zeae*

Figura 5 (Continuação)

destacadas; possivelmente, estas regiões estejam envolvidas com a ligação da proteína ao grupo prostético heme. Em uma dessas regiões, o resíduo de cisteína absolutamente conservado entre os citocromos P450 foi, também, evidenciado (Figura 5).

4.2. Análises do número de cópias dos genes *abcC11* e *cypC11* no genoma do isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum*

O banco genômico, utilizado para obtenção da sequência dos genes *abcC11* e *cypC11*, foi construído a partir do DNA total do isolado LV49 da raça 81 de *C. lindemuthianum*. Entretanto, após vários anos de manipulação em laboratório, o isolado LV49 teve sua capacidade de infecção ao feijoeiro reduzida. Assim, para todos os ensaios realizados neste trabalho, foi utilizado o isolado A₂ 2-3 da Raça 89 de *C. lindemuthianum*, o qual mantém uma alta virulência ao feijoeiro comum (*P. vulgaris*). No primeiro ensaio, foi determinado o número de cópias dos genes *abcC11* e *cypC11* no genoma de *C. lindemuthianum* por hibridização.

Na análise do número de cópias do gene *abcC11*, foi observado que este gene está presente em cópia única no genoma do isolado selvagem A₂ 2-3 da Raça 89 de *C. lindemuthianum*, pois, uma única banda específica foi constatada na hibridização, quando utilizadas enzimas que não clivam dentro do gene ou dentro da sequência usada como sonda (*Bgl*II, *Kpn*I, *Xba*I, *Sph*I e *Scal*), sendo que apenas duas bandas foram observadas na análise com a enzima *Nco*I, que possui um sítio de clivagem dentro da sequência da sonda 1 (Figura 2 e Figura 6B).

Para a análise do número de cópias do gene *cypC11*, a mesma membrana foi utilizada, após lavagem da sonda 1 e rehibridização com a sonda 2 (Figura 2). Na hibridização com a sonda 2 (Figura 6C), foi observada uma única banda quando utilizadas as enzimas *Bgl*II e *Xba*I que não clivam dentro do gene, e duas bandas quando utilizadas as enzimas *Kpn*I e *Nco*I, que possuem um sítio de clivagem dentro do gene. Na análise com a enzima *Scal*, que também não cliva dentro da sequência do gene *cypC11*, duas bandas foram detectadas, sendo uma de maior tamanho e intensidade e outra menos intensa e com o mesmo tamanho da banda observada na hibridização com a

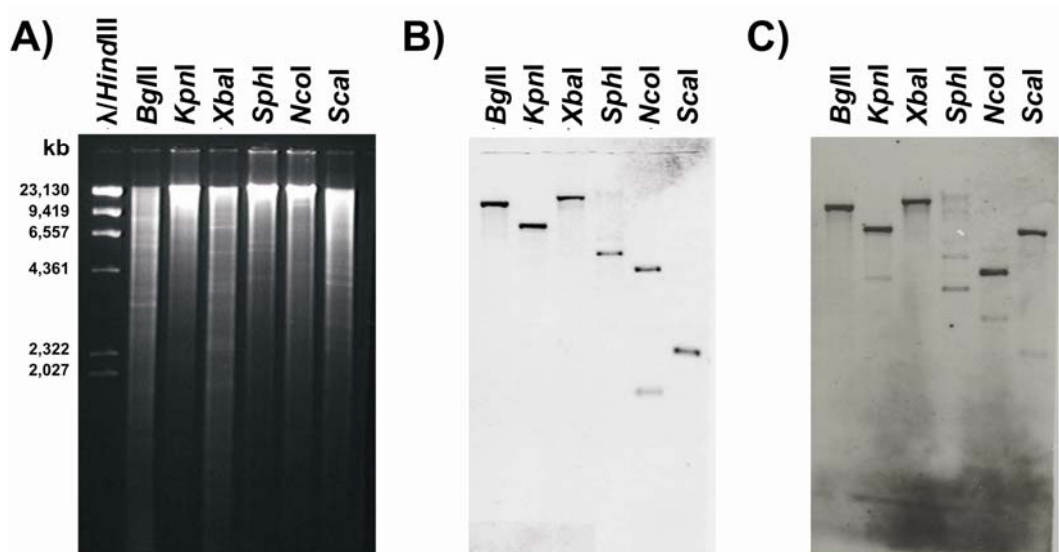


Figura 6 – Avaliação do número de cópias do gene *abcC11* e *cypC11*, no genoma do isolado selvagem A₂ 2-3 Raça 89 de *C. lindemuthianum*. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% das clivagens do DNA total; (B) Autoradiografia da hibridização utilizando, como sonda, um fragmento de DNA de aproximadamente 1,57 kb interno ao gene *abcC11* (sonda 1); (C) Autoradiografia da hibridização utilizando, como sonda, um fragmento de DNA de aproximadamente 2,26 kb contendo parte do gene *cypC11* (sonda 2).

sonda 1. O sinal dessa banda menor não era esperado e acredita-se que ele tenha sido gerado por um resquício da sonda 1, que permaneceu hibridizada nessa posição, mesmo após os tratamentos da membrana para a sua remoção. Na análise com a enzima *SphI*, que possui dois sítios de clivagem dentro da sequência da sonda 2, um pequeno arraste contendo fragmentos de DNA de alto peso molecular foi observado, possivelmente, devido à clivagem parcial do DNA. Logo abaixo, duas bandas esperadas com maior intensidade foram detectadas; entretanto, a terceira banda esperada com tamanho de 571 pb não pode ser visualizada devido à sujeira (*background*) na parte inferior da radiografia. Contudo, na análise geral da radiografia, foi concluído que o gene *cypCl1* está presente em cópia única no genoma do isolado selvagem A₂ 2-3 da Raça 89 de *C. lindemuthianum*.

4.3. Inativação do gene *abcCl1*

A partir do vetor pABC-S (Figura 2), um fragmento interno do gene *abcCl1* com 2.695 pb foi subclonado no vetor pSM1 para a construção de um vetor de inativação gênica, mediada por integração via recombinação homóloga. O vetor construído, denominado pSM1ABC (Figura 1), foi utilizado para obtenção de transformantes de *C. lindemuthianum*, a fim de investigar o efeito desse possível transportador ABC na capacidade de *C. lindemuthianum* em infectar e gerar lesões necróticas no tecido foliar do feijoeiro comum (*P. vulgaris*).

Dos 118 transformantes obtidos, 20 foram purificados monosporicamente e submetidos ao teste de patogenicidade. Após onze dias de teste, notou-se a ausência de sintomas nas folhas inoculadas com dois transformantes e uma grande redução dos sintomas nas folhas infectadas com outros oito transformantes. Comparado à linhagem selvagem, foi observado, também, um notável atraso no aparecimento dos sintomas em folhas infectadas com determinados transformantes, sendo que, por exemplo, após uma semana ainda não se evidenciava nenhuma lesão necrótica nas folhas infectadas com seis dos vinte transformantes analisados (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2 – Avaliação dos sintomas nas folhas de feijoeiro comum, infectadas com esporos dos transformantes

Avaliação dos sintomas após 7 dias da inoculação			Avaliação dos sintomas após 11 dias da inoculação		
Sintomas	Transformantes	Total	Sintomas	Transformantes	Total
Ausentes	89A20; 89C20; 89B14; 89B17; 89E07 e 89A13	6/20	Ausentes	89A20 e 89B17	2/20
Reduzidos	89C12; 89A01; 89B23; 89B19 e 89B15	5/20	Reduzidos	89C12; 89A01; 89B23; 89B19; 89C20; 89B14; 89E07; e 89A13	8/20
Elevados	89C08; 89E12; 89A09; 89A18; 89B22; 89A11; 89C18; 89C03 e 89C04	9/20	Elevados	89C08; 89E12; 89A09; 89A18; 89B22; 89A11; 89C18; 89C03; 89C04 e 89B15	10/20

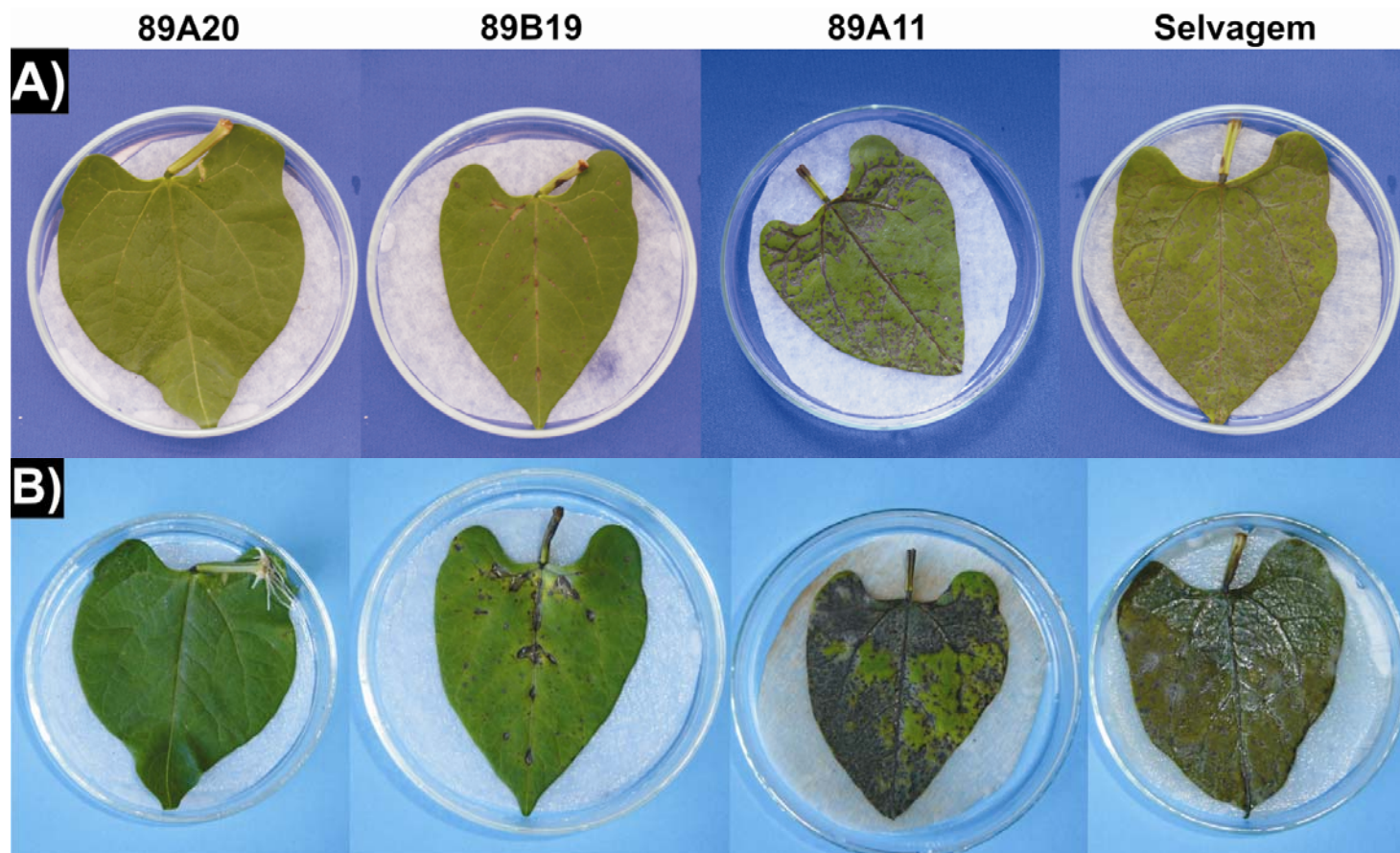


Figura 7 – Teste de patogenicidade em folhas de feijoeiro comum, ilustrando os sintomas: ausentes (transformante 89A20), reduzidos (transformante 89B19), e elevados (transformante 89A11 e selvagem A₂ 2-3 raça 89). (A) Avaliação dos sintomas após 7 dias da inoculação. (B) Avaliação dos sintomas após 11 dias da inoculação.

Análises preliminares dos transformantes 89A20, 89C20, 89E07 e 89B19 por meio de hibridização (dados não mostrados) revelaram a ocorrência de uma integração ectópica do vetor pSM1ABC no genoma dos transformantes 89E07 e 89A20, bem como uma possível deleção de parte da região do locus do gene *abcC11* no genoma do transformante B19, e a ocorrência de uma integração direcionada do vetor pSM1ABC ao locus do gene *abcC11* no genoma do transformante 89C20.

Uma caracterização molecular mais detalhada da integração do vetor pSM1ABC no genoma do transformante com redução na patogenicidade 89C20 foi realizada por meio de hibridização, utilizando-se, como sonda, um fragmento de DNA de aproximadamente 1,57 kb interno ao gene *abcC11* (sonda 1) e também o vetor pBluescriptII (Figura 8). Neste transformante, verificou-se que a integração do vetor foi realmente direcionada ao locus do gene *abcC11*, pois, na análise em que se utilizou a enzima *Bgl*II, que não possui sítio de restrição dentro da sequência de DNA do gene e nem dentro do vetor, verificou-se um aumento no tamanho da banda relativa ao gene *abcC11*, em comparação àquela do selvagem (Figura 8B). Além disso, na análise utilizando a enzima *Kpn*I (a qual não cliva dentro do gene, mas possui um sítio de clivagem no vetor) observou-se a presença de uma terceira banda com tamanho semelhante ao do vetor (aproximadamente 9,4 kb) e com maior intensidade que as demais, indicando que, no transformante 89C20, o gene *abcC11* foi interrompido por meio de uma integração em *tandem* do vetor (Figura 8B). Bandas com maior intensidade, presentes no DNA do transformante e ausentes no genoma selvagem, também foram observadas em análises com outras enzimas de restrição (Figura 8B). A presença do vetor pSM1ABC integrado em *tandem* e apenas no locus do gene *abcC11* foi confirmada também na análise da hibridização, utilizando como sonda o vetor pBluescriptII (Figura 8C).

4.4. Análise da expressão relativa dos genes *abcC11* e *cypC11*

O selvagem A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* foi crescido na ausência de drogas e, depois, transferido para um novo meio contendo solventes ou concentrações subinibitórias de higromicina, eugenol, pisatina,

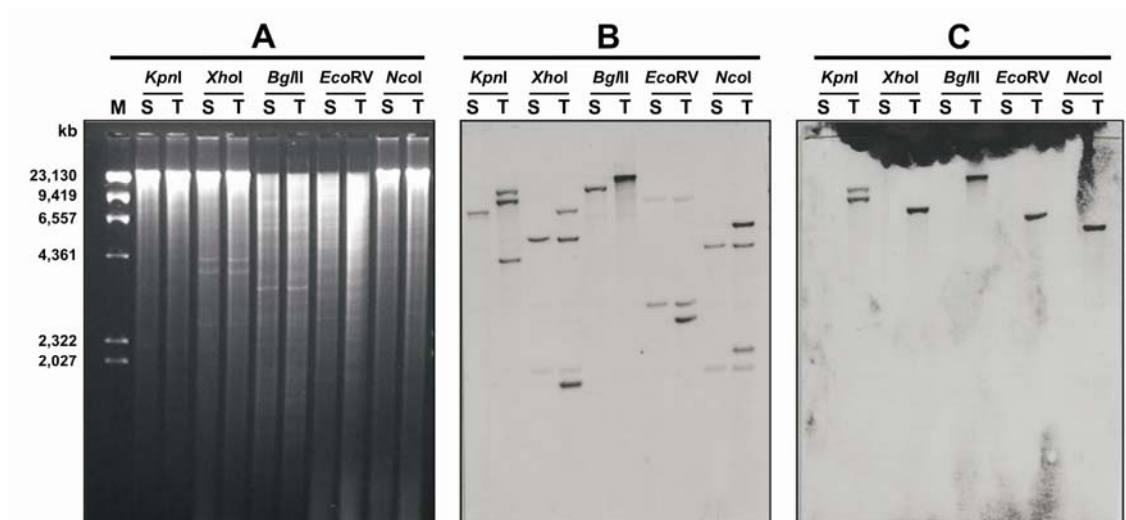


Figura 8 – Caracterização molecular da integração do vetor pSM1ABC no genoma do transformante 89C20. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% das clivagens do DNA total de *C. lindemuthianum* selvagem e transformante T89C20; (B) Auto-radiografia da hibridização utilizando, como sonda, um fragmento de DNA de aproximadamente 1,57 kb interno ao gene *abcC11* – sonda 1; (C) Auto-radiografia da hibridização utilizando, como sonda, o vetor pBluescript II. M = Lambda/*Hind*III, S = Selvagem *C. lindemuthianum* (Raça 89; isolado A₂ 2-3), T = Transformante 89C20.

psoralen ou camptotecina, onde permaneceu durante 8 h. O RNA total foi isolado e analisado quanto aos níveis de transcrição relativa de cada gene. Os mesmos cDNAs foram usados na PCR em tempo real, para monitorar a indução na expressão de *abcC1* e *cypC1*. A ausência de DNA contaminante nas amostras de cDNA foi confirmada com os oligonucleotídeos CLABCq1 e CLABCq2, que foram desenhados próximos às junções íntron-éxons do provável íntron de 49 pb do gene *abcC1*. A amplificação do DNA genômico e das amostras de cDNA com esses oligonucleotídeos revelou uma diferença de bandas compatível ao tamanho de 49 pb estimado para o íntron e provou a eficiência do tratamento dos cDNAs com DNase (Dados não apresentados).

As análises da expressão relativa dos genes *abcC1* e *cypC1* foram realizadas, utilizando-se a PCR em tempo real pelo método da curva-padrão. Devido a um melhor ajuste entre as curvas-padrão, o RNA ribossômico (rRNA) foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos níveis de expressão do gene *abcC1*, enquanto o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) foi a referência endógena para a normalização dos transcritos de *cypC1*.

A Tabela 3 apresenta os resultados da quantificação relativa dos níveis de expressão do gene *abcC1*. Os transcritos de *abcC1* foram induzidos cerca de 12,623; 6,888; 3,799; e 2,169 vezes, quando o fungo foi crescido na presença de eugenol (0,01%), higromicina (10 µg/mL), pisatina (10 µg/mL), e camptotecina (20 µg/mL), respectivamente. Um menor aumento na expressão de *abcC1* foi observado também, após tratamento com psoralen (20 ou 10 µg/mL) e camptotecina (10 µg/mL), em que a indução foi cerca de 1,627; 1,512 e 1,264 vezes, respectivamente.

Os resultados da expressão relativa do gene *cypC1* são apresentados na Tabela 4. Os transcritos de *cypC1* apresentaram um aumento na expressão em cerca de 4,962; 2,408; 2,225 e 1,284 vezes, quando *C. lindemuthianum* foi cultivado na presença de higromicina (10 µg/mL), pisatina (10 µg/mL), eugenol (0,01%) e psoralen (20 µg/mL), respectivamente. Para os outros tratamentos, não houve um aumento significativo nos níveis de transcritos de *cypC1*.

Tabela 3 – Quantificação relativa da expressão de *abcC1* na presença de drogas por PCR em tempo real

Composto	C _T Médio (<i>abcC1</i>)	Quantidade média normalizada (<i>abcC1</i>)	Quantificação relativa
Nenhum (calibrador)	22,366	0,006	1,000 ±0,202
Higromicina 10 µg/mL	18,923	0,038	6,888 ±0,502
Eugenol 0,01%	18,402	0,070	12,623 ±1,167
DMSO 50 µL Etanol 250 µL (calibrador)	21,904	0,008	1,000 ±0,081
Pisatina 10 µg/mL	19,203	0,029	3,799 ±0,451
Psoralen 10 µg/mL	19,977	0,012	1,512 ±0,088
Camptotecina 10 µg/mL	20,862	0,010	1,264 ±0,136
DMSO 100 µL (calibrador)	20,760	0,011	1,000 ±0,048
Psoralen 20 µg/mL	19,333	0,018	1,627 ±0,191
Camptotecina 20 µg/mL	19,621	0,024	2,169 ±0,181

Os níveis relativos do mRNA *abcC1* em cada amostra foram normalizados, usando-se o RNA ribossômico (rRNA) como controle endógeno. As amplificações do alvo e da referência endógena foram realizadas na mesma placa. A quantidade de mRNAs do gene *abcC1* e de transcritos de rRNA foi determinada, a partir de curvas-padrões preparadas para ambos, alvo (*abcC1*) e controle endógeno (rRNA). Para obter um valor normalizado, a quantidade do alvo foi dividida pela quantidade da referência endógena. Os valores normalizados de *abcC1* para cada amostra experimental (fungo crescido na presença de drogas) foram divididos pelo valor normalizado de *abcC1* do calibrador (fungo crescido na ausência de drogas ou na presença de solventes), para gerar os dados da expressão relativa. A quantificação relativa representa o número de vezes que o gene *abcC1* é expresso, em comparação com a amostra não tratada (calibrador). Os resultados correspondem a valores médios de três repetições.

Tabela 4 – Quantificação relativa da expressão de *cypC11* na presença de drogas por PCR em tempo real

Composto	C _T Médio (<i>cypC11</i>)	Quantidade média normalizada (<i>cypC11</i>)	Quantificação relativa
Nenhum (calibrador)	27,932	0,002	1,000 ± 0,034
Higromicina 10 µg/mL	25,534	0,011	4,962 ± 0,344
Eugenol 0,01%	26,547	0,005	2,225 ± 0,075
DMSO 50 µL Etanol 250 µL (calibrador)	30,658	0,001	1,000 ± 0,147
Pisatina 10 µg/mL	25,804	0,004	2,408 ± 0,141
Psoralen 10 µg/mL	26,125	0,002	1,144 ± 0,051
Camptotecina 10 µg/mL	28,702	0,001	0,960 ± 0,036
DMSO 100 µL (calibrador)	27,912	0,002	1,000 ± 0,040
Psoralen 20 µg/mL	25,339	0,003	1,284 ± 0,087
Camptotecina 20 µg/mL	25,849	0,002	1,006 ± 0,030

Os níveis relativos do mRNA *cypC11* em cada amostra foram normalizados, utilizando-se o mRNA da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) como controle endógeno. As amplificações do alvo e da referência endógena foram corridas na mesma placa. A quantidade de mRNAs dos genes *cypC11* e *gpd* foi determinada, a partir de curvas-padrões preparadas para o alvo (*cypC11*) e controle endógeno (*gpd*). Para obter um valor normalizado, a quantidade do alvo foi dividida pela quantidade da referência endógena. Os valores normalizados de *cypC11* para cada amostra experimental (fungo crescido na presença de drogas) foram divididos pelo valor normalizado de *cypC11* do calibrador (fungo crescido na ausência de drogas ou na presença de solventes), a fim de gerar os dados da expressão relativa. A quantificação relativa representa o número de vezes que o gene *cypC11* é expresso, em comparação com a amostra não tratada (calibrador). Os resultados correspondem a valores médios de três repetições.

5. DISCUSSÃO

Os genes *abcC11* e *cypC11* codificam um transportador ABC e uma monoxigenase dependente de citocromo P450, respectivamente, em *C. lindemuthianum*. Estes genes estão presentes em um agrupamento no genoma do fungo, conforme revelado pelo sequenciamento de um fragmento de DNA de 8,4 kb da biblioteca genômica de *C. lindemuthianum* e, ainda, pelo perfil de hibridização apresentado por eles (Figura 2 e Figura 6). Embora codifiquem proteínas totalmente diferentes, estes dois genes, possivelmente, estão envolvidos em um mesmo processo: a resistência do fungo a compostos tóxicos. A ligação física entre eles pode sugerir a presença, em *C. lindemuthianum*, de uma região genômica especializada, contendo vários genes relacionados com um mesmo processo, como ocorre com as chamadas ilhas genômicas encontradas em bactérias (Hacker *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008). Embora existam estruturas similares no genoma de fungos (Fedorova *et al.*, 2008), nestes microrganismos o mais comum é a presença de um cromossomo inteiro contendo genes, não essenciais para a sobrevivência, mas relacionados, por exemplo, com o processo de patogenicidade. São os chamados cromossomos supranumerários (Covert, 1998). Em *N. haematococca*, um fungo fitopatogênico com ampla gama de hospedeiros, os genes necessários para a determinação da patogenicidade à ervilha (*P. sativum*) estão organizados em *cluster* em um cromossomo supranumerário (Han *et al.*, 2001). Dentre estes genes estão: *PDA1*, que codifica um citocromo P450 específico para a detoxicação de pisatina; e *PEP5*, que parece estar relacionado com membros da superfamília de transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Se os genes *abcC11* e *cypC11* fazem parte de um agrupamento genômico, que contém mais genes envolvidos na resistência a substâncias tóxicas, ou estão localizados em um cromossomo supranumerário importante para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*, futuras análises serão necessárias.

A sequência protéica, deduzida do gene *abcC11*, possui 73% de identidade de aminoácidos com o transportador *Abc1* de *M. grisea*. Foi demonstrado que o gene *ABC1* constitui um importante fator de virulência de *M. grisea*, necessário, provavelmente, nos primeiros estágios da infecção, para a exportação de toxinas fúngicas ou como bomba de efluxo de compostos de

defesa da planta (Urban *et al.*, 1999). Os fungos *M. grisea* e *C. lindemuthianum* são organismos hemibiotróficos, que apresentam grande semelhança entre os processos iniciais de infecção de suas plantas hospedeiras (Talbot, 1995; Perfect *et al.*, 1999; Munch *et al.*, 2008; Ribot *et al.*, 2008). Tal semelhança sugere a possibilidade que genes de patogenicidade similar sejam requeridos por estes dois microrganismos para que ocorra o estabelecimento da doença. De fato, um experimento de complementação intergênica foi realizado com sucesso entre *M. grisea* e *C. lindemuthianum* (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). O gene *PLS1* de *M. grisea* está envolvido na reorganização do citoesqueleto, durante a formação do peg de penetração. Os mutantes *pls1⁻* não são patogênicos e desenvolvem apressórios, que são incapazes de formar pegs de penetração (Clergeot *et al.*, 2001). O gene *CIPLS1* de *C. lindemuthianum* é um homólogo funcional de *MgPLS1*, que pode complementar o defeito patogênico na linhagem mutante *pls1⁻* de *M. grisea* (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). Então, para testar se o gene *abcC1* também é importante para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*, assim como o gene *ABC1* de *M. grisea*, o isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* foi transformado com o vetor pSM1ABC para obtenção de mutantes com o gene *abcC1* inativado.

Tanto o mutante 89C20, contendo o gene *abcC1* interrompido por uma integração em *tandem* do vetor (Figura 8), quanto o mutante 89B19 apresentando uma possível deleção no locus do gene *abcC1* (dados não mostrados) tiveram sua virulência a folhas de feijoeiro comum bastante reduzida (Tabela 2 e Figura 7). Estes resultados indicam que o gene *abcC1* é importante para o estabelecimento da patogenicidade de *C. lindemuthianum*, embora não seja o único fator determinante. Assim, se a função do transportador ABCC1 de *C. lindemuthianum* está relacionada com o efluxo de substâncias tóxicas produzidas pela planta, outros mecanismos complementares de destoxificação são, provavelmente, empregados por este fungo. A descoberta do gene *cypC1*, que codifica uma proteína do tipo citocromo P450, ligado ao gene *abcC1* pode dar suporte a esta hipótese.

Para se defenderem de compostos tóxicos, os fungos fitopatogênicos podem empregar mecanismos não-degradativos e, ou mecanismos enzimáticos de destoxificação (Morrissey & Osbourn, 1999; VanEtten *et al.*, 2001; Duffy *et al.*, 2003). Em *C. lindemuthianum*, estas duas estratégias de defesa contra compostos tóxicos parecem estar presentes, sendo mediadas

por, pelo menos, um transportador ABC (codificado pelo gene *abcC11*) e um citocromo P450 (codificado pelo gene *cypC11*). Os genes *abcC11* e *cypC11* estão presentes em cópia única no genoma do isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* e sofrem indução de expressão gênica, quando este fungo é cultivado em meio contendo antibiótico, fitoalexina ou metabólito secundário de plantas. A quantificação da expressão de *abcC11*, utilizando a PCR em tempo real (Tabela 3), mostrou que este gene tem sua expressão aumentada, principalmente, na presença de eugenol (um composto fenólico, produto do metabolismo secundário de plantas) e do antibiótico higromicina. A expressão de *abcC11* também responde, positivamente, às fitoalexinas psoralen, camptotecina e, principalmente, pisatina. Estes resultados indicam que *abcC11* pode codificar um transportador ABC capaz de conferir resistência a *C. lindemuthianum* a múltiplos compostos tóxicos não-relacionados e ser importante para que o fungo consiga superar os mecanismos de defesa da planta e estabelecer a doença. A quantificação da expressão de *cypC11* (Tabela 4) mostrou também, embora em menor amplitude, um aumento na expressão deste gene em resposta à presença no meio de higromicina, pisatina e eugenol. Um efeito de concentração foi observado na análise da expressão de *cypC11* na presença de psoralen, em que houve um aumento na expressão em torno de 1,284 vezes com 20 µg/mL de psoralen e não houve um aumento significativo nos níveis de transcritos de *cypC11*, quando foram utilizados apenas 10 µg/mL desta fitoalexina. Devido a um maior aumento na expressão de *abcC11* frente a uma maior diversidade de substâncias tóxicas, é provável que o transportador ABCC11 constitua a primeira linha de defesa de *C. lindemuthianum* contra compostos tóxicos, enquanto uma possível destoxificação enzimática por meio de CYP11 possa fornecer uma via secundária de neutralização desses compostos.

Alternativamente, uma atuação em conjunto dos produtos desses dois genes, para a destoxificação de compostos tóxicos, também não pode ser descartada. Um exemplo do acoplamento entre mecanismos degradativos e não-degradativos para tolerância a compostos antifúngicos é encontrado em *B. cinerea*. Este fungo fitopatogênico resiste ao antibiótico fenólico de amplo espectro 2,4-DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) empregando a bomba de efluxo BcAtrB, que previne o acúmulo de 2,4-DAPG dentro da célula, e a lacase extracelular BcLCC2, que medeia a subsequente degradação de 2,4-DAPG, na

presença de ácido tânico (Schouten *et al.*, 2008). Ainda não é possível determinar a localização exata da proteína CYPC11 em *C. lindemuthianum*. Por apresentar uma sequência peptídeo sinal, CYPC11 pode ser secretada para o espaço extracelular, ficar retida no retículo endoplasmático ou mesmo ser direcionada para outras organelas. Caso CYPC11 seja excretada para o meio extracelular, uma atuação conjunta entre ABCC11 e CYPC11 poderia ocorrer de forma similar ao mecanismo BcAtrB/BcLCC2 de *B. cinerea*. Por outro lado, se presente em uma organela intracelular, o citocromo P450 de *C. lindemuthianum* poderia atuar sobre determinadas substâncias tóxicas, convertendo-as em compostos mais passíveis de sofrerem efluxo através do transportador ABCC11. Para provar a veracidade desta hipótese de atuação acoplada entre ABCC11 e CYPC11, será necessário obter mutantes com *cypC11* inativado, ou mesmo mutantes contendo os dois genes, *abcC11* e *cypC11*, inativados, além de subsequentes testes toxicológicos com possíveis substratos para estas proteínas.

Kievitone e phaseollidin são fitoalexinas isoflavonóides produzidas pela leguminosa *P. vulgaris*, que precisam ser neutralizadas por patógenos que infectam o feijoeiro (Morrissey & Osbourn, 1999). A detoxicação enzimática de Kievitone e phaseollidin pelo patógeno *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hansen envolve hidratação de uma dupla ligação presente no grupamento alil ligado à porção isoflavonóide dessas duas fitoalexinas (Turbek *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1995). Estas e outras fitoalexinas, produzidas por *P. vulgaris*, constituem os mais prováveis substratos naturais para as proteínas ABCC11 e CYPC11 de *C. lindemuthianum*. Durante os primeiros estágios da infecção a *P. vulgaris*, o fungo *C. lindemuthianum* poderia tolerar os efeitos tóxicos destas fitoalexinas, por meio da bomba de efluxo codificada pelo gene *abcC11*, conforme demonstrado pela redução na virulência dos mutantes 89C20 e 89B19 a folhas de feijoeiro comum. Alternativamente, as fitoalexinas do feijoeiro comum poderiam ser detoxicadas pelo citocromo P450 codificado pelo gene *cypC11*, por meio de uma grande possibilidade de reações (Mansuy, 1998; Isin & Guengerich, 2007). Apesar da ausência de fitoalexinas produzidas pelo feijoeiro, nos ensaios realizados neste trabalho, as análises de expressão gênica mostraram que os genes *abcC11* e *cypC11* apresentam aumento de expressão em resposta à pisatina, uma fitoalexina produzida pela também leguminosa *P. sativum*.

Nos ensaios de patogenicidade com os transformantes de *C. lindemuthianum* (Tabela 2 e Figura 7), dois transformantes foram completamente não-patogênicos a folhas de feijoeiro comum, após 11 dias de teste: o transformante 89A20, apresentando uma integração ectópica do vetor pSM1ABC (dados não mostrados); e o transformante 89B17, não caracterizado. Certamente, a integração do vetor pSM1ABC no genoma destes transformantes interrompeu algum processo-chave para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*, que poderá, futuramente, ser caracterizado.

Mutantes *abcC11*⁻ (89C20 e 89B19) apresentam redução na capacidade de gerar lesões necróticas a folhas de feijoeiro comum, em comparação com a linhagem selvagem de *C. lindemuthianum*. Isso indica que o gene *abcC11* representa um importante fator de virulência de *C. lindemuthianum* a *P. vulgaris*, podendo tornar-se também um alvo atrativo para controle químico deste fungo fitopatogênico. A importância do papel dos transportadores ABC no fenótipo de resistência a multidrogas (MDR), apresentado por células cancerígenas, tem despertado grande interesse na descoberta de agentes farmacológicos, que inibem a atividade de transportadores ABC. Estes agentes são conhecidos na literatura médica como moduladores, uma vez que podem reduzir o fenótipo de MDR na oncologia (Robert & Jarry, 2003; Ponte-Sucre, 2007). O uso desses moduladores da atividade de transportadores ABC poderia potencializar a ação de fungicidas no combate aos patógenos de plantas. De fato, o emprego de alguns moduladores em conjunto com o fungicida cyproconazole mostrou-se promissor para o controle do fitopatógeno *M. graminicola* (Roohparvar *et al.*, 2007).

Inibidores da atividade de citocromos P450 de mamíferos também são conhecidos (Murray & Reidy, 1990). Alguns desses compostos são também fortes inibidores da atividade de PDAs (*pisatin demethylases*), encontradas em fitopatógenos de ervilha (George & VanEtten, 2001).

A redução na patogenicidade de mutantes *abcC11*⁻ e a indução na expressão dos genes *abcC11* e *cypC11* por eugenol e pisatina, dentre outros compostos tóxicos, indicam que estes genes podem ter atuação decisiva durante o processo de interação planta-microrganismo, proporcionando resistência do fungo aos compostos de defesa da planta. Assim, as proteínas ABCC11 e CYPC11 representam potenciais alvos para o emprego de inibidores, que utilizados em conjunto com fungicidas poderiam constituir, no futuro, um

eficiente método de controle da antracnose do feijoeiro comum, causada pelo fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

6. REFERÊNCIAS

- Alexander, N. J., Hohn, T. M. & McCormick, S. P. (1998).** The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **64**, 221-225.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Alzate-Marin, A. L., de Souza, K. A., Silva, M. G. D., de Oliveira, E. J., Moreira, M. A. & de Barros, E. G. (2007).** Genetic characterization of anthracnose resistance genes Co-4(3) and Co-9 in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). *Euphytica* **154**, 1-8.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M. (1999).** Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 361-398.
- Andrade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J. G. M. & De Waard, M. A. (2000a).** The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiol-Uk* **146**, 1987-1997.
- Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G., Peery, R. B., Skatrud, P. L. & De Waard, M. A. (2000b).** The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol Gen Genet* **263**, 966-977.
- Azzaria, M., Schurr, E. & Gros, P. (1989).** Discrete Mutations Introduced in the Predicted Nucleotide-Binding Sites of the Mdr1 Gene Abolish Its Ability to Confer Multidrug Resistance. *Mol Cell Biol* **9**, 5289-5297.
- Bailey, J. A., Jeger, M. J. & British Society for Plant Pathology. (1992).** *Colletotrichum : biology, pathology and control*. Wallingford, Oxon, UK: C.A.B. International.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L. & Goffeau, A. (1994).** PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J Biol Chem* **269**, 2206-2214.
- Barrus, M. F. (1921).** *Bean anthracnose*. Ithaca, N.Y.: Cornell University.
- Bauer, B. E., Wolfger, H. & Kuchler, K. (1999).** Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 217-236.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55-128.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. & Desjardins, A. E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* **36**, 224-233.

Christensen, P. U., Davey, J. & Nielsen, O. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* **255**, 226-236.

Clergeot, P. H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M. P., Pepin, R., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H. (2001). PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6963-6968.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

[<http://www.conab.gov.br/conabweb/>]. Acesso 30 de janeiro de 2009.

Covert, S. F. (1998). Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr Genet* **33**, 311-319.

de Waard, M. A. (1997). Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pestic Sci* **51**, 271-275.

de Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I. & Zwiers, L. H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci* **62**, 195-207.

Deber, C. M., Wang, C., Liu, L. P., Prior, A. S., Agrawal, S., Muskat, B. L. & Cuticchia, A. J. (2001). TM Finder: a prediction program for transmembrane protein segments using a combination of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales. *Protein Sci* **10**, 212-219.

Degtyarenko, K. N. (1995). Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Eng* **8**, 737-747.

Del Sorbo, G., Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G., Van Kan, J. A., Balzi, E. & De Waard, M. A. (1997). Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol Gen Genet* **254**, 417-426.

Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. & De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol* **30**, 1-15.

Del Sorbo, G., Ruocco, M., Schoonbeek, H. J., Scala, F., Pane, C., Vinale, F. & De Waard, M. A. (2008). Cloning and functional characterization of BcatrA, a gene encoding an ABC transporter of the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol Res* **112**, 737-746.

Delserone, L. M., McCluskey, K., Matthews, D. E. & Vanetten, H. D. (1999). Pisatin demethylation by fungal pathogens and nonpathogens of pea: association with pisatin tolerance and virulence. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**, 317-326.

deWaard, M. A. (1997). Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pestic Sci* **51**, 271-275.

Dillard, H. R. & Cobb, A. C. (1993). Survival of *Colletotrichum-Lindemuthianum* in Bean Debris in New-York-State. *Plant Dis* **77**, 1233-1238.

Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1990). Molecular Communication in Interactions between Plants and Microbial Pathogens. *Annu Rev Plant Phys* **41**, 339-367.

Dixon, R. A., Harrison, M. J. & Lamb, C. J. (1994). Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 479-501.

Duffy, B., Schouten, A. & Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 501-538.

Dufresne, M., Bailey, J. A., Dron, M. & Langin, T. (1998). clk1, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 99-108.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
[<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm>]. Acesso 30 de janeiro de 2009.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
[<http://faostat.fao.org/>]. Acesso 14 de abril de 2008.

Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S. & other authors (2008). Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* **4**, e1000046.

Fernandez-Ortuno, D., Tores, J. A., de Vicente, A. & Perez-Garcia, A. (2008). Mechanisms of resistance to Qol fungicides in phytopathogenic fungi. *Int Microbiol* **11**, 1-9.

Fleibner, A., Sopalla, C. & Weltring, K. M. (2002). An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 102-108.

Fuscaldi, K.C. & Prado, G.R. (2005). Análise econômica da cultura do feijão. *Revista de Política Agrícola* **XIV(1)**, 17-30.

Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T. & other authors (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis*

subsp. michiganensis NCPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol* **190**, 2138-2149.

George, H. L. & VanEtten, H. D. (2001). Characterization of pisatin-inducible cytochrome P450s in fungal pathogens of pea that detoxify the pea phytoalexin pisatin. *Fungal Genet Biol* **33**, 37-48.

Greenberger, L. M. (1993). Major Photoaffinity Drug Labeling Sites for Iodoaryl Azidoprazosin in P-Glycoprotein Are within, or Immediately C-Terminal to, Transmembrane Domain-6 and Domain-12. *J Biol Chem* **268**, 11417-11425.

Gulshan, K. & Moye-Rowley, W. S. (2007). Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot Cell* **6**, 1933-1942.

Gupta, A. & Chattoo, B. B. (2008). Functional analysis of a novel ABC transporter ABC4 from *Magnaporthe grisea*. *Fems Microbiol Lett* **278**, 22-28.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**, 1089-1097.

Hamer, J. E. & Holden, D. W. (1997). Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: A commentary. *Fungal Genet Biol* **21**, 11-16.

Han, Y., Liu, X., Benny, U., Kistler, H. C. & VanEtten, H. D. (2001). Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J* **25**, 305-314.

Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**, 41-62.

Heath, M. C., Valent, B., Howard, R. J. & Chumley, F. G. (1990). Correlations between Cytologically Detected Plant-Fungal Interactions and Pathogenicity of *Magnaporthe grisea* toward Weeping Lovegrass. *Phytopathology* **80**, 1382-1386.

Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.

Higgins, C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**, 749-757.

Hohn, T. M., McCormick, S. P. & Desjardins, A. E. (1993). Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet* **24**, 291-295.

Hohn, T. M., Desjardins, A. E. & McCormick, S. P. (1995). The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol Gen Genet* **248**, 95-102.

Hu, W., Yan, L. & Ma, Z. (2008). Cloning and expression analysis of a putative ABC transporter gene BgABC1 from the biotrophic pathogenic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *J Phytopathol* **156**, 120-124.

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. & other authors (1990). Structural Model of Atp-Binding Proteins Associated with Cystic-Fibrosis, Multidrug Resistance and Bacterial Transport. *Nature* **346**, 362-365.

Idnurm, A. & Howlett, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* **2**, 241-255.

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Isin, E. M. & Guengerich, F. P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 314-329.

Kinghorn, J. R. & Turner, G. (1992). *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, 1st edn. London ; New York: Blackie Academic & Professional.

Knogge, W. (1998). Fungal pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 324-328.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. & other authors (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

Lewis, K. (1994). Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem Sci* **19**, 119-123.

Li, D., Chung, K. R., Smith, D. A. & Schardl, C. L. (1995). The *Fusarium solani* gene encoding kievitone hydratase, a secreted enzyme that catalyzes detoxification of a bean phytoalexin. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 388-397.

Locher, K. P. (2009). Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 239-245.

Loo, T. W. & Clarke, D. M. (1995). Covalent Modification of Human P-Glycoprotein Mutants Containing a Single Cysteine in Either Nucleotide-Binding Fold Abolishes Drug-Stimulated Atpase Activity. *J Biol Chem* **270**, 22957-22961.

Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **121**, 5-14.

Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C., Jr., Phillips, T. D. & Beremand, M. N. (2003). Tri1 encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new Tri gene. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1607-1613.

Morrissey, J. P. & Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 708-724.

Müller, K.O. & Börger, H. (1940). Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-resistenz den Kartoffel. Arbeiten aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Fortswirtschaft (Berlin) **23**, 189-231.

Munch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N. & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol* **165**, 41-51.

Murray, M. & Reidy, G. F. (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacol Rev* **42**, 85-101.

Nakajima, M., Suzuki, J., Hosaka, T., Hibi, T. & Akutsu, K. (2001). Functional Analysis of an ATP-Binding Cassette Transporter Gene in *Botrytis cinerea* by Gene Disruption. *J Gen Plant Pathol* **67**, 212-214.

Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K. & Hibi, T. (1998). A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3983-3988.

Nakaune, R., Hamamoto, H., Imada, J., Akutsu, K. & Hibi, T. (2002). A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Mol Genet Genomics* **267**, 179-185.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T. & other authors (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.

Nelson, D. R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**, 1-10.

Oconnell, R. J., Bailey, J. A. & Richmond, D. V. (1985). Cytology and Physiology of Infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Plant Pathol* **27**, 75-98.

Oliveira, M. C. (2006). Sequenciamento e análise de fragmentos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD) de *Colletotrichum lindemuthianum* visando à detecção de elementos transponíveis, marcadores moleculares e genes de patogenicidade. In *Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa como conclusão da disciplina Estágio Supervisionado – BQI 499*, pp. 43. Viçosa: UFV.

Oliver, R. & Osbourn, A. (1995). Molecular Dissection of Fungal Phytopathogenicity. *Microbiol-Uk* **141**, 1-9.

Omura, T. & Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**, 1375-1376.

Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-34.

- Parisot, D., Dufresne, M., Veneault, C., Lauge, R. & Langin, T. (2002).** *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol Genet Genomics* **268**, 139-151.
- Park, J., Lee, S., Choi, J., Ahn, K., Park, B., Park, J., Kang, S. & Lee, Y. H. (2008).** Fungal cytochrome p450 database. *Bmc Genomics* **9**, -.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J. & Green, J. R. (1999).** *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet Biol* **27**, 186-198.
- Poggeler, S., Masloff, S., Hoff, B., Mayrhofer, S. & Kuck, U. (2003).** Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Curr Genet* **43**, 54-61.
- Ponte-Sucre, A. (2007).** Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl Microbiol Biot* **76**, 279-286.
- Porter, T. D. & Coon, M. J. (1991).** Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **266**, 13469-13472.
- Prebble, E. & Anderson, M. (1998).** DNA extraction: miniprep. The Aspergillus website [<http://www.aspergillus.org.uk/>]. Acesso 14 de abril de 2008.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M. & McCormick, S. P. (1995).** Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 593-601.
- Ragagnin, V. A., Alzate-Marin, A. L., Souza, T. L. P. O., Arruda, K. M. A., Moreira, M. A. & Barros, E. G. (2003).** Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. *Fitopatol Bras* **28**, 591-596.
- Redman, R. S. & Rodriguez, R. J. (1994).** Factors Affecting the Efficient Transformation of *Colletotrichum* Species. *Exp Mycol* **18**, 230-246.
- Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Notteghem, J. L., Lebrun, M. H. & Morel, J. B. (2008).** Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *J Plant Physiol* **165**, 114-124.
- Robert, J. & Jarry, C. (2003).** Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* **46**, 4805-4817.
- Rodriguez-Guerra, R., Ramirez-Rueda, M. T., de la Vega, O. M. & Simpson, J. (2003).** Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathol* **52**, 228-235.

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.

Roohparvar, R., Huser, A., Zwiers, L. H. & De Waard, M. A. (2007). Control of *Mycosphaerella graminicola* on wheat seedlings by medical drugs known to modulate the activity of ATP-binding cassette transporters. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5011-5019.

Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C. & Higgins, C. F. (1997). Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* **272**, 10685-10694.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1987). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schafer, W. (1994). Molecular Mechanisms of Fungal Pathogenicity to Plants. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 461-477.

Schnabel, G., Dai, Q. & Paradkar, M. R. (2003). Cloning and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene MFABC1 and the alternative oxidase gene MfAOX1 from *Monilinia fructicola*. *Pest Manag Sci* **59**, 1143-1151.

Schoonbeek, H., Del Sorbo, G. & De Waard, M. A. (2001). The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe In* **14**, 562-571.

Schouten, A., Maksimova, O., Cuesta-Arenas, Y., van den Berg, G. & Raaijmakers, J. M. (2008). Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol* **10**, 1145-1157.

Semighini, C. P., Marins, M., Goldman, M. H. & Goldman, G. H. (2002). Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1351-1357.

Sicard, D., Buchet, S., Michalakakis, Y. & Neema, C. (1997). Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in wild populations of common bean. *Plant Pathol* **46**, 355-365.

Silva, K. J. D. E., De Souza, E. A. & Ishikawa, F. H. (2007). Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *J Phytopathol* **155**, 241-247.

Soares, M. A. (2007). Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum. In *Departamento de Microbiologia*, pp. 197. Viçosa: UFV.

Steffens, J. J., Pell, E. J. & Tien, M. (1996). Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 348-355.

Stergiopoulos, I., Zwiers, L. H. & De Waard, M. A. (2002). Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *Eur J Plant Pathol* **108**, 719-734.

Stergiopoulos, I., Zwiers, L. H. & De Waard, M. A. (2003). The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. *Mol Plant Microbe In* **16**, 689-698.

Sun, C. B., Suresh, A., Deng, Y. Z. & Naqvi, N. I. (2006). A Multidrug Resistance Transporter in *Magnaporthe* Is Required for Host Penetration and for Survival during Oxidative Stress. *Plant Cell* **18**, 3686-3705.

Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Farrall, L., Chumley, F. G. & Valent, B. (1998). *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe In* **11**, 404-412.

Talbot, N. J. (1995). Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends Microbiol* **3**, 9-16.

Theodoulou, F. L. (2000). Plant ABC transporters. *Bba-Biomembranes* **1465**, 79-103.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J* **14**, 779-790.

Tu, J. C. (1981). Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) on White Bean (*Phaseolus vulgaris* L) in Southern Ontario - Spread of the Disease from an Infection Focus. *Plant Dis* **65**, 477-480.

Tu, J. C. (1983). Epidemiology of Anthracnose Caused by *Colletotrichum lindemuthianum* on White Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Southern Ontario - Survival of the Pathogen. *Plant Dis* **67**, 402-404.

Tu, J. C. (1988). Control of Bean Anthracnose Caused by the Delta-Race and Lambda-Race of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. *Plant Dis* **72**, 5-8.

Turbek, C. S., Smith, D. A. & Schardl, C. L. (1992). An extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* which catalyses hydration of the isoflavonoid phytoalexin, phaseollidin. *FEMS Microbiol Lett* **73**, 187-190.

- Urban, M., Bhargava, T. & Hamer, J. E. (1999).** An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *Embo J* **18**, 512-521.
- Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S. & Schmid, R. D. (2004).** Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 317-325.
- van den Brink, H. J. M., van Gorcom, R. F. M., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J. (1998).** Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* **23**, 1-17.
- VanEtten, H., Temporini, E. & Wasmann, C. (2001).** Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol Mol Plant P* **59**, 83-93.
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. & Farmer, E. E. (1994).** Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* **6**, 1191-1192.
- Veneault-Fourrey, C., Parisot, D., Gourgues, M., Lauge, R., Lebrun, M. H. & Langin, T. (2005).** The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Genet Biol* **42**, 306-318.
- Vieira, C., Júnior, T. J. P. & Borém, A. (2006).** *Feijão*, 2nd edn, pp. 600. Viçosa: Editora - UFV.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. (2000).** Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**, 3003.1-9.
- White, R. E. & Coon, M. J. (1980).** Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem* **49**, 315-356.
- Zhang, X. P., Collins, K. I. & Greenberger, L. M. (1995).** Functional Evidence That Transmembrane-12 and the Loop between Transmembrane-11 and Transmembrane-12 Form Part of the Drug-Binding Domain in P-Glycoprotein Encoded by Mdr1. *J Biol Chem* **270**, 5441-5448.
- Zwiers, L. H., Stergiopoulos, I., Gielkens, M. M., Goodall, S. D. & De Waard, M. A. (2003).** ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Mol Genet Genomics* **269**, 499-507.