

MONALESSA FÁBIA PEREIRA

**ESTUDO FUNCIONAL DO GENE QUE CODIFICA UM
TRANSPORTADOR DE MEMBRANA MFS EM
*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
2011

MONALESSA FÁBIA PEREIRA

**ESTUDO FUNCIONAL DO GENE QUE CODIFICA UM
TRANSPORTADOR DE MEMBRANA MFS EM
*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: 18 de fevereiro de 2011

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Coorientadora)

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus, por estar sempre guiando meus passos, amparando-me nas dificuldades e dando discernimento em minhas decisões.

À meus pais e irmãos pelo amor incondicional. Pelo carinho recebido toda vez que volto para casa, que me faz sentir que ali está meu porto seguro. Por compreender os motivos da minha ausência em muitos momentos. Por vibrarem com minhas alegrias e vitórias e pelo apoio dedicado a mim nos momentos de fragilidade. Amo vocês!

Às minhas tias Lídia, Ester e Dalira, pelo amor e dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia por ter me proporcionado esta experiência.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela orientação, ensinamentos e apoio recebidos diariamente durante a execução deste trabalho. Obrigada por toda confiança, dedicação e amizade, que certamente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Elza Fernandes de Araújo, por me co-orientar neste trabalho, por todo incentivo e exemplo de profissionalismo e competência.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela co-orientação, entusiasmo e otimismo demonstrado durante este trabalho.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya por todo apoio e confiança.

Aos professores Everaldo Gonçalves de Barros e Poliane Alfenas Zerbini pela disponibilidade na banca de defesa da dissertação.

À Jaqueline e Regina, pela organização e cuidado com o laboratório. Obrigada pela amizade e apoio.

Aos funcionários do departamento que contribuíram de diferentes formas para a realização deste trabalho, especialmente a Danilo, Evandro, Nilcéia, Paulo e Rita.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos pela ótima convivência, pela descontração do cafezinho e auxílio durante a execução dos experimentos.

Aos amigos: Alexandre por todos BDAs preparados, Bruno pelo auxílio nas análises estatísticas, Guilherme pela companhia nas transformações e cultivo do nosso *Colletotrichum*,

Tiago Leite pelo auxílio nas análises filogenéticas e especialmente a Carolina, que me ajudou a dar os primeiros passos dentro do laboratório de Genética e me acompanhou durante a execução deste trabalho. A vocês um obrigada mais do que especial.

À Livia e Thamy pelo companheirismo e pela forte amizade.

Às “Meninas do 302”, Dani, Fê, Lily e Tati, pelo acolhimento em Viçosa, pelas conversas e gargalhadas, pelas palavras de apoio e constante companhia.

BIOGRAFIA

Monalessa Fábria Pereira, filha de Moisés Pereira e Zeliani Santa Sperandio Pereira, nasceu em 21 de março de 1984, em São Gabriel da Palha-ES.

Em março de 2005, iniciou o curso de Ciências Biológicas, no Centro Universitário Vila Velha, graduando-se como Bacharel em julho de 2008.

Em março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> : características gerais.....	3
2.2. A Antracnose do feijoeiro.....	4
2.3. Raças Fisiológicas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	8
2.4. Transportadores MFS.....	9
2.5. Estudo da função de genes.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Micro-organismos e condições de cultivo.....	17
3.2. Sequência do gene <i>mfs1</i> e análise da região flanqueadora 3'.....	17
3.3. Organização do gene <i>mfs1</i> no genoma de <i>C. lindemuthianum</i>	18
3.3.1. Obtenção de massa micelial.....	18
3.3.2. Extração do DNA total de <i>C. lindemuthianum</i>	18
3.3.3. Clivagem do DNA total de <i>C. lindemuthianum</i>	19
3.3.4. Obtenção da membrana para hibridização.....	19
3.3.5. Obtenção e marcação da sonda.....	19
3.3.6. Condições de hibridização.....	20
3.4. Inativação do gene <i>mfs1</i>	21
3.5. Transformação de <i>C. lindemuthianum</i>	23
3.6. Estabilidade mitótica dos transformantes.....	24
3.7. Triagem dos transformantes com integração específica.....	24
3.8. Caracterização molecular dos transformantes.....	24
3.9. Análise fenotípica do mutante $\Delta mfs1$	25
3.9.1. Teste de patogenicidade.....	25
3.9.2. Avaliação da sensibilidade micelial de <i>C. lindemuthianum</i> a diferentes Fungicidas.....	26

3. 9. 3. Avaliação do crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> em diferentes açúcares.....	27
3. 9. 4. Avaliação da germinação de conídios de <i>C.lindemuthianum</i>	28
3. 9. 5. Avaliação da conidiação de <i>C. lindemuthianum</i>	28
3. 10. Análise filogenética do gene <i>mfs1</i>	28
4. RESULTADOS.....	31
4. 1. Sequência do gene <i>mfs1</i> e análise da região flanqueadora 3'.....	31
4. 2. Organização do gene <i>mfs1</i> no genoma de <i>C.lindemuthianum</i>	35
4. 3. Inativação do gene <i>mfs1</i>	36
4. 4. Transformação de protoplastos de <i>C. lindemuthianum</i>	37
4. 5. Estabilidade mitótica dos transformantes.....	37
4. 6. Triagem dos transformantes: identificação do mutante $\Delta mfs1$	38
4. 7. Caracterização molecular dos transformantes.....	39
4. 8. Análise fenotípica do mutante $\Delta mfs1$: análise funcional do gene <i>mfs1</i>	41
4. 8. 1. Teste de patogenicidade.....	41
4.8. 2. Avaliação da sensibilidade micelial de <i>C. lindemuthianum</i> a diferentes fungicidas.....	43
4.8. 3. Avaliação do crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> em diferentes fontes de Açúcares.....	45
4.8.4. Avaliação da produção e da germinação de conídios em <i>C. lindemuthianum</i>	47
4.9. Análise filogenética do gene <i>mfs1</i>	50
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

1. Estratégia de inativação gênica pela técnica de <i>Split-Marker</i>	22
2. Mapa de restrição do fragmento de DNA de 6,5 Kb.....	31
3. Sequência de nucleotídeos do gene <i>ft1</i> e sequência deduzida de aminoácidos da proteína Ft1 de <i>C. lindemuthianum</i>	33
4. Família de reguladores transcricionais de fungos.....	34
5. Caracterização da região promotora do gene <i>mfs1</i>	35
6. Organização do gene <i>mfs1</i> no genoma de <i>C. lindemuthianum</i> raça 89.....	36
7. Confirmação dos fragmentos de DNA obtidos por PCR.....	37
8. Confirmação do mutante para o gene <i>mfs1</i>	38
9. Caracterização molecular dos transformantes: determinação do número de cópias do gene <i>mfs1</i> e tipo de integração.....	39
10. Caracterização molecular dos transformantes: determinação do número de cópias do gene <i>hyg</i> e tipo de integração.....	40
11. Análise da patogenicidade de <i>C. lindemuthianum</i> $\Delta mfs1$	42
12. Eficiência dos fungicidas mancozeb, tebuconazole, e óxido cuproso na inibição do crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e mutante.....	44
13. Crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e mutante $\Delta mfs1$ em diferentes fontes de açúcares.....	46
14. Crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e mutante $\Delta mfs1$ em diferentes fontes de açúcares.....	47
15. Conidiação de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e do mutante $\Delta mfs1$	48
16. Germinação de conídios de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e mutante $\Delta mfs1$	49
17. Árvore filogenética de membros da superfamília MFS pertencentes ao Filo Ascomycota, incluindo a proteína Mfs1 de <i>C. lindemuthianum</i> (HQ54132.2).....	51
18. Árvore filogenética de membros da família SP pertencentes ao Filo Ascomycota, incluindo a proteína Mfs1 de <i>C. lindemuthianum</i>	52

LISTA DE TABELAS

1.Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	20
2.Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (raça 89) selvagem e mutante $\Delta mfs1$	26
3.Espécies fúngicas, números de acesso no GenBank e família das proteínas transportadoras MFS, cujas sequências de aminoácidos foram utilizadas neste trabalho.....	29
4.Espécies fúngicas, números de acesso no GenBank e tipo de açúcares transportados por proteínas da família SP (<i>Sugar Porter</i>), cujas sequências de aminoácidos foram utilizadas neste trabalho.....	30
5.Espécies de fungos, números de acesso no GenBank e similaridade da proteína <i>ft1</i> com outras proteínas pertencentes à família de reguladores transcricionais de fungos filamentosos.....	34
6.Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> selvagem e $\Delta mfs1$, e a concentração mínima inibitória (CMI) de cada fungicida testado.....	43

RESUMO

PEREIRA, Monalessa Fábila. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Estudo funcional do gene que codifica um transportador de membrana MFS em *Colletotrichum lindemuthianum***. Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadores: Elza Fernandes de Araújo e Marisa Vieira de Queiroz.

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro comum. Este fungo, assim como outros fungos fitopatógenos estão constantemente expostos a uma grande variedade de compostos tóxicos provenientes de várias fontes, o que torna imprescindível para estes o desenvolvimento de mecanismos de proteção contra estes produtos. Uma dessas estratégias está relacionada com a presença de proteínas transportadoras de membrana, como as pertencentes à Principal Superfamília Facilitadora (MFS), que podem fornecer aos fungos proteção contra compostos tóxicos evitando ou minimizando a ação destes, sendo em sua maioria essenciais para a manutenção da viabilidade celular. Este trabalho teve como objetivo inativar o gene *mfs1* que codifica para um transportador de membrana da família MFS e investigar as alterações fenotípicas ocasionadas em um mutante *C. lindemuthianum* isolado LV49 (raça 89) para este gene. Para a obtenção do mutante foi necessário confirmar que o gene *mfs1* encontrava-se presente em cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*. O gene *mfs1* pode estar organizado em um conjunto de genes com funções relacionadas, uma vez que downstream à região 3' deste foi identificada uma segunda janela aberta de leitura correspondente a uma proteína da superfamília de fatores de transcrição contendo o domínio Zn₂-Cys₆, identificado como *clft1*. A análise do promotor do gene *mfs1* revelou um putativo *cis* elemento de reconhecimento por proteínas desta família, o que sugere que esta proteína possa estar relacionada à regulação da expressão de *mfs1*. A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*, possibilitando o estudo da função do gene *mfs1*, em um mutante com integração específica e livre de integrações ectópicas. O mutante $\Delta mfs1$ não mostrou diferenças no perfil de sensibilidade a drogas comumente empregadas no controle da antracnose e em relação à patogenicidade, o mutante induziu mais precocemente os sintomas em folhas de feijoeiro susceptível, evidenciando uma situação de estresse decorrente da ausência do produto gênico. Foi observado também que o gene *mfs1* exerce um papel primordial na manutenção da viabilidade celular de *C. lindemuthianum*, fato este confirmado pela conidiação alterada e pela confirmação de que este gene codifica para um transportador de membrana específico no transporte de hexoses, especificamente glicose, manose e frutose, uma vez que o mutante $\Delta mfs1$ mostrou crescimento reduzido quando cultivado em meios contendo apenas glicose, manose e frutose como fontes de carbono. A análise filogenética da proteína Mfs1 associada aos outros resultados obtidos nos sugere que este transportador é um

membro da família SP, e que as proteínas MFS estão fortemente relacionadas com o tipo de substância que é transportada. Estudos de natureza básica sobre transportadores MFS são importantes para ampliar os conhecimentos sobre estas proteínas e a viabilidade celular em *C. lindemuthianum*.

ABSTRACT

PEREIRA, Monalessa Fábila. Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Functional study of a gene that encodes a MFS membrane transporter in *Colletotrichum lindemuthianum***. Adviser: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Marisa Vieira de Queiroz.

Colletotrichum lindemuthianum is the causal agent of common bean antracnose. This fungus, like other phytopatogens, is constantly exposed to several toxic compounds from many sources, what makes indispensable the development of protection strategies against these products. One of these strategies is related to membrane transporters proteins like the Major Facilitator Superfamily (MFS), that could provide protection against toxic compounds or minimizing its action, being essential for the fungal cellular viability maintenance. In this context, this work aimed to inactivate the *mfs1* gene encoding a MFS membrane transporter and investigate the phenotypic alterations entailed in an isolate *C. lindemuthianum* mutant LV49 (race 89) for this gene. To obtain the mutant, it was necessary to confirm if *mfs1* gene was organized as a single copy in the *C. lindemuthianum* genome. The *mfs1* gene can be organized in a cluster in view that a second open reading frame, which corresponds to a transcription factor superfamily containing a Zn₂-Cys₆ domain, identified as *clft1*, was observed in 3' downstream region of this gene. The *mfs1* promoter analysis revealed a putative *mfs1* element that is recognized by proteins of this family, what suggests that this protein could be related to the *mfs1* expression regulation. The *Split-Marker* technique proved to be efficient in *C. lindemuthianum mfs1* gene inactivation enabling the study of *mfs1* function in a mutant by specific integrations without ectopic integrations. The $\Delta mfs1$ mutant showed no differences in drug sensibility profile when commonly drugs employed in antracnose control was used and in relation to pathogenicity, the mutant symptoms started earlier on susceptible bean leaves, showing a stress situation due to the genic product absence. It was also observed that *mfs1* presents a primordial role in *C. lindemuthianum* cellular viability maintenance, what was confirmed by the altered conidiation observed, confirming that this gene encodes for a specific hexose membrane transporter, specifically carbon sources like glucose, mannose and fructose. The protein Mfs1 phylogenetic analysis allow us to conclude that this transporter is a SP family member and the MFS proteins are strongly related with the transported substance. Studies conducted with MFS transporters are important to broaden the knowledge of these proteins and to understand the cell viability in *C. lindemuthianum*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Esta leguminosa apresenta grande relevância na dieta do brasileiro, além de ser considerada um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, devido ao grande número de trabalhadores empregados durante o ciclo da cultura. O feijão não apresenta um comércio internacional intenso, pois a maioria dos países produz para o consumo interno e, eventualmente exporta este produto.

Entre os fatores que afetam a produtividade do feijoeiro, destacam-se as enfermidades promovidas por patógenos (vírus, bactérias, fungos e nematóides). A antracnose do feijoeiro é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, que se caracteriza pela formação de lesões escuras sobre o tecido vegetal. Entre os métodos de controle da antracnose destaca-se a utilização de variedades de feijoeiro resistentes, uso de fungicidas e rotação de cultura.

Na natureza, os micro-organismos, especificamente os fungos fitopatógenos são constantemente expostos a uma grande variedade de compostos tóxicos endógenos e exógenos provenientes de várias fontes, sendo assim, o fungo requer estratégias para se proteger contra a exposição a esses produtos. Uma dessas estratégias está relacionada com a presença de proteínas transportadoras de membranas, como as pertencentes à Superfamília de Facilitadores Principais (MFS). As proteínas MFS estão envolvidas no transporte de uma ampla variedade de compostos, utilizando-se de mecanismos uniporte, simporte e antiporte. O transporte destes produtos é dirigido por força próton-motora, caracterizando um sistema de transporte secundário. Dessa forma, os transportadores MFS podem fornecer aos fungos proteção contra compostos tóxicos presentes em seu habitat natural e também evitar o acúmulo de substâncias tóxicas citoplasmáticas produzidas pelo seu próprio metabolismo secundário, evitando ou minimizando a sua ação tóxica.

O estudo de transportadores MFS em *C. lindemuthianum* permitirá um melhor conhecimento dessas proteínas, visto que na literatura há poucos trabalhos sobre este tipo de transportadores em fungos filamentosos fitopatógenos. Tendo em vista a importância do cultivo do feijão comum no Brasil e principalmente no Estado de Minas Gerais, estudos de natureza básica sobre estes transportadores podem auxiliar no entendimento de mecanismos fisiológicos de *C. lindemuthianum*, como o seu papel na manutenção da viabilidade celular. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos inativar e estudar funcionalmente o gene *mfs1*

que codifica para um transportador de membrana da família MFS e investigar as alterações fenotípicas no mutante de *Colletotrichum lindemuthianum* isolado LV49 (raça 89).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Phaseolus vulgaris*: características gerais

O gênero *Phaseolus* (divisão Angiospermae; classe Dicotyledoneae; ordem Rosales; família Fabaceae) possui cerca de 55 espécies, sendo cinco cultiváveis: *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum); *P. lunatus* (feijão de lima); *P. coccineus* (feijão Ayocote); *P. acutifolius* (feijão tepari) e o *P. polyanthus*. Destas espécies, o feijão comum é a mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e também a mais utilizada nos cinco continentes (VIEIRA et al., 2006).

Segundo um levantamento arqueológico feito por Kaplan (1965), o feijão comum é uma leguminosa originária de regiões da antiga cultura Inca. Atualmente, acredita-se que o feijão-comum teve três centros de domesticação. O primeiro centro localiza-se na região central das Américas, principalmente no México, onde se originou a maioria dos cultivares de grãos pequenos. O segundo localiza-se no sul dos Andes, principalmente no norte da Argentina e no sul do Peru, onde se originaram os cultivares de sementes grandes. A terceira área de domesticação situa-se na Colômbia.

Com a descoberta das Américas, o cultivo e o consumo do feijão foi disperso por todo mundo. O feijão é cultivado em cerca de 107 países, devido a sua grande capacidade de adaptação às mais diferentes condições edafoclimáticas (YOKOYAMA, 2000).

Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor de feijão, seguido do México, com relação à produção do feijão comum, o Brasil também ocupa o primeiro lugar, seguido da China, Índia, México e EUA (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2009). O feijão é cultivado em praticamente todo o território nacional, porém, grande parte da produção está concentrada nos seguintes estados: Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2011).

Dados de novembro de 2010, mostrados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), revelam que a produção nacional de feijão vem aumentando nos últimos anos. Com exceção do Rio Grande do Sul e São Paulo, os principais Estados produtores indicam plantios de áreas maiores do que as cultivadas na safra anterior. Os bons preços na comercialização atual é um dos fatores mais citados para este aumento na área de plantio. É estimado que a produção de feijão primeira safra em 2011 atinja 1,53 a 1,59 milhões de toneladas, representando um crescimento entre 4,8 % e 8,5 %. Considerando as três safras,

estima-se que a área total de feijão, seja de 3,57 a 3,61 milhões de hectares. Com isso a produção nacional de feijão deverá chegar a 3,4 milhões de toneladas.

Em Minas Gerais, o segundo maior produtor de feijão de primeira safra (14,6 % do volume total na safra anterior), estima-se um crescimento de 3,1 % a 4,1 % em relação a safra anterior. Os bons preços de comercialização no mercado são fatores que justificam este crescimento (CONAB, 2011).

O rendimento da produção do feijoeiro comum pode ser afetado por diversos fatores como: falta de nutrientes no solo; predominância de cultivo associado com outras culturas; ataque de pragas e incidência de diversas enfermidades. As enfermidades trazem grandes perdas ao rendimento da cultura do feijão. Costuma-se classificar as enfermidades que atingem o feijoeiro de acordo com o agente causal (vírus, bactérias, fungos ou nematóides) e a importância econômica. Entre as doenças fúngicas de maior importância encontram-se a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), o oídio (*Erysiphe polygoni*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) a podridão do colo (*Sclerotium rolfsii*) e o carvão (*Microbotryum phaseoli*) (VIEIRA, 1988).

2.2. A antracnose do feijoeiro

Antracnose é um tipo de doença que se caracteriza pela formação de lesões escuras sobre o tecido vegetal. Na maioria dos casos, a antracnose é promovida por espécies do gênero *Colletotrichum* os quais são classificados taxonomicamente dentro do reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Sordariomycetes; Ordem Phyllachorales e Família Phyllachoraceae (BAYLEY & JEGER, 1992).

O gênero *Colletotrichum* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo cereais, hortaliças, leguminosas, culturas perenes e árvores frutíferas, sendo amplamente distribuído pelo mundo, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América Latina, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento do patógeno (BAYLEY e JEGER, 1992). Neste contexto, esta doença acomete culturas vegetais de grande importância econômica, sendo assim, os estudos sobre diferenciação e interação planta-patógeno concentram-se predominantemente nas espécies fúngicas que ocasionam doenças em tais espécies vegetais (THAN, 2008).

O agente causal da antracnose no feijoeiro é o *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav., que foi descrito originalmente por Saccardo & Magnus, em 1878,

como *Gloeosporium lindemuthianum* (BAILEY & JEGER, 1992), em material coletado por Lindemuth, em Bonn, Alemanha. Posteriormente, Scribner, ao verificar a presença de setas, que são estruturas filamentosas produzidas entre os conidióforos e as margens dos acérvulos, o transferiu para o gênero *Colletotrichum*.

A antracnose, causada por *C. lindemuthianum* é considerada uma das doenças mais graves da cultura do feijoeiro no Brasil, uma vez que pode ocorrer em toda parte aérea da planta e raramente nas raízes, e ao encontrar condições favoráveis, pode causar grandes danos na produção (RAVA et al., 1994; PAULA JÚNIOR & ZAMBOLIM, 1998; RAVA, 2002). Esta doença é de distribuição ampla, já tendo sido constatada em vários países da Europa, Ásia, África e América. No Brasil, ocorre nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba. Esta ampla abrangência deve-se provavelmente ao uso de cultivares suscetíveis em regiões onde ocorrem temperaturas amenas, variando de 13 a 26 °C, em determinadas épocas do ano, e alta umidade, o que pode ocasionar redução na produção de até 100% (CHAVES, 1980; RAVA et al., 1994).

O agente causal da antracnose no feijoeiro apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita, onde recebe o nome de *C. lindemuthianum*, e outra sexuada ou perfeita, onde é chamado de *Glomerella cingulata* (ROCA et al., 2003).

Na fase sexuada, este fungo produz esporos sexuais ou ascósporos dentro de uma estrutura em forma de saco denominada asco, que por sua vez, está localizado em corpos de frutificação chamados peritécios, os quais possuem um formato levemente arredondado, aproximando-se do formato de uma pera (BAYLEY & JEGER, 1992; KIMATI et al., 1997).

A fase assexuada de *C. lindemuthianum* é caracterizada pela produção de conídios em uma estrutura especializada denominada de acérvulo (BAYLEY & JEGER, 1992). Dentro dos acérvulos, os conídios encontram-se envolvidos por uma mucilagem composta por glicoproteínas de alta massa molecular que impedem a germinação e também protegem os conídios da dissecação e da ação tóxica de alguns metabólitos vegetais. Os conídios são estruturas unicelulares hialinas, de forma oblonga ou circular. A fixação inicial de conídios de *C. lindemuthianum* à cutícula do hospedeiro, envolve interações hidrofóbicas, como é o caso de muitos outros patógenos de plantas. A superfície dos conídios de *C. lindemuthianum* é coberta por uma camada de material fibrilar disposto perpendicularmente à parede celular com uma aparência reticular na secção oblíqua, denominado de capa do conídio. Esta camada com aspecto de escova que reveste os esporos foi também encontrada nos conídios de

Colletotrichum truncatum, o que sugere que ela esteja relacionada com a adesão do conídio à superfície vegetal (O'CONNELL et al., 1996).

A germinação do conídio ocorre após sua adesão em superfície vegetal. O início desse processo pode ser estimulado por fatores físicos e químicos, que podem variar de acordo com as espécies. Estudos realizados por Flaishman et al. (1995), mostram que a cera presente na epiderme do abacate, e também a produção de etileno são fatores capazes de induzir a germinação e a formação do apressório em *Colletotrichum gloeosporioides*. Além dos fatores químicos, características físicas do ambiente são percebidas pelo fungo e podem atuar como um sinal no controle da expressão gênica, por exemplo, o simples contato com a superfície rígida do vegetal pode ser um sinal para o controle da expressão de genes (LIU et al., 1998).

Quando em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, a esporulação é abundante, formando uma massa de conídios de coloração róseo-alaranjada. Durante a germinação, o conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos ou continuar crescendo, levando à formação de hifas septadas e ramificadas (CHAVES, 1980).

O fungo *C. lindemuthianum*, assim como outras espécies do gênero *Colletotrichum* é considerado um fungo hemibiotrófico, pois se comporta no início da fase de infecção como biotrófico, onde os nutrientes são obtidos a partir do tecido ainda vivo dos vegetais, por meio do desenvolvimento de estruturas especializadas de infecção, como o apressório, a vesícula e as hifas primárias; e uma fase necrotrófica no final da colonização, onde as hifas secundárias penetram no tecido do hospedeiro entre ou mesmo dentro das células, possibilitando a obtenção de nutrientes essenciais, caracterizando a necrose tecidual típica da doença (MUNCH et al., 2008).

Quando as condições são favoráveis, os conídios germinam e emitem o tubo germinativo em aproximadamente 18 horas após a sua deposição sobre a folha do hospedeiro. Um apressório melanizado é formado na extremidade do tubo germinativo, a partir de tal estrutura, uma hifa *peg* de penetração é diferenciada, podendo então atravessar a parede celular da primeira célula vegetal. Este processo deve ser acompanhado por uma forte e controlada secreção de enzimas hidrolíticas (BAYLEY & JEGGER, 1992).

Entre a parede celular e a membrana plasmática da célula epidérmica ocorre a formação de uma vesícula de infecção, cuja função não foi totalmente esclarecida, mas existem evidências que a formação de tal estrutura pode estar envolvida com a manutenção da viabilidade da célula vegetal infectada, ou ainda estar relacionada com a supressão das respostas de defesa do hospedeiro compatível. A partir da vesícula de infecção, diferencia-se

uma hifa que cresce entre a membrana plasmática e a parede celular de células epidérmicas e corticais. A presença das hifas promoverá mudanças estruturais no citoplasma, porém as mesmas permanecerão vivas. Após aproximadamente 48 horas do início da infecção, é possível observar rupturas no tonoplasto e no plasmalema, promovendo uma desorganização do citoplasma dentro de 60 horas (O'CONNELL et al., 1985; PERFECT et al., 1999).

Cerca de 120 horas após o início da infecção, o micélio primário ramifica-se em hifas secundárias, estas hifas apresentam um menor diâmetro e são capazes de crescer intercelularmente através da parede celular ou da lamela média, e até mesmo invadir o lúmen de células vegetais mortas, caracterizando assim a fase necrotrófica típica. Os sintomas macroscópicos da antracnose, como por exemplo, o surgimento de manchas necróticas amarronzadas, tornam-se evidentes e característicos cerca de 8 dias após o início da infecção, quando as hifas secundárias já colonizaram completamente o córtex vegetal (PERFECT et al., 1999).

As características da antracnose podem ser observadas em todas as fases do desenvolvimento da planta, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes. Nas folhas, as lesões estabelecem-se preferencialmente sobre as nervuras da superfície abaxial e dos pecíolos. Com o colapso dos feixes vasculares localizados nas nervuras, ocorre uma interrupção do fluxo normal de água e fotoassimilados para as diversas regiões da folha. Na vagem, ocorrem lesões arredondadas de coloração escura, deprimidas e de tamanho variável e nas plântulas, é possível observar lesões nos cotilédones ou hipocótilo, o que pode então levar a morte destas (SCHWARTZ, 1991).

O patógeno sobrevive de uma estação a outra, ou de um cultivo a outro, como micélio dormente no interior do tegumento da semente nas células dos cotilédones ou em restos culturais, na forma de esporos. A transmissão a longa distância é realizada pela semente contaminada e a curta distância, pelos respingos da água de chuva, insetos, animais, homens e implementos agrícolas. Condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, como a temperatura moderada, entre 13 °C e 26 °C, associadas a alta umidade relativa do ar, acompanhado de chuvas moderadas e ventos, são essenciais para a disseminação local do conídio e desenvolvimento de epidemias, podendo causar grandes perdas no rendimento da cultura. Quanto mais cedo a doença aparece na cultura, maiores são as perdas na produtividade (VIEIRA, 1988).

2.3. Raças Fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *C. lindemuthianum* possui ampla variabilidade em relação à capacidade de causar doenças em vários cultivares de feijão comum. Tal variabilidade é identificada como diferentes raças fisiológicas. A mutação e a recombinação são responsáveis pela variabilidade genética em fungos. Com esses fenômenos surgem novas combinações alélicas nas populações, às quais sofrem seleção e dispersão quando ocorrem migrações de indivíduos de um local ao outro (LESLIE & DICKMAN, 1991; citado por ROCCA 2002). Devido a esta ampla variabilidade torna-se essencial o monitoramento constante deste patógeno, para que sejam descobertas novas fontes de resistência e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novas cultivares resistentes, com o propósito de controlar a doença (RAVA et al., 1994).

No Brasil, o primeiro estudo de identificação de raças em *C. lindemuthianum* foi realizado em 1966, por Kimati, a partir de isolados de São Paulo, no qual foram identificadas duas raças pertencentes aos grupos Alfa Mexicano II e Delta. A partir de isolados coletados no Rio Grande do Sul, nas safras de 1965 e 1966, foram identificadas as raças Alfa e Beta (AUGUSTIN & COSTA, 1971). As raças Brasileiro I, Mexicano I, Alfa (70 % de frequência) e Beta foram encontradas em isolados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina; a raça Gama em isolados de Santa Catarina (OLIVEIRA et al., 1973) e o grupo Brasileiro II, em Minas Gerais (OLIARI et al., 1973).

Em 1988, durante a conferência *Primer Taller de Anthracnose Del Fríjol em América Latina*, foi sugerida uma padronização universal das cultivares diferenciadoras e uma metodologia padrão para a nomenclatura de raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*, como forma de facilitar o desenvolvimento de programas de melhoramento. Utilizando esta nova metodologia Rava e colaboradores (1994) classificaram 25 raças de *C. lindemuthianum* no Brasil, pertencentes aos antigos grupos alfa, delta, gama, Mexicano I, Mexicano II, e Brasileiro I. Mais de 50 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* já foram identificadas nas diversas regiões produtoras de feijão no Brasil, sendo as raças 64, 65, 73, 81, 87 e 89 as de maior frequência no país (ALZATE-MARIN & SARTORATO, 2004).

Estudos realizados no Estado de Minas Gerais, confirmam que *C. lindemuthianum* apresenta a patogenicidade altamente variável. Entre as 10 raças fisiológicas encontradas, a raça 65 foi a mais frequente, sendo distribuída em todo estado de MG, seguido pelas raças 81 e 73 (DAMASCENO et al., 2007). A raça 89 apresenta grande capacidade de dispersão e alta agressividade, podendo reduzir a colheita de feijão em até 100 % (ANSARI et al., 2004).

2.4. Transportadores MFS

Os fungos fitopatógenos são constantemente expostos a uma grande variedade de compostos tóxicos provenientes de várias fontes, tais como antibióticos produzidos por outros micro-organismos, produtos de defesa das plantas, fungicidas sintéticos e também substâncias tóxicas de origem endógena, como antibióticos e micotoxinas que fornecem ao organismo uma vantagem competitiva em seu habitat ecológico. Sendo assim, o fungo requer estratégias para se proteger contra a exposição a produtos tóxicos exógenos e também contra a auto toxicidade das toxinas endógenas (DE WAARD, 1997). Os mecanismos de proteção dos fungos fitopatógenos podem ser de origem qualitativa ou quantitativa, onde os fatores qualitativos estão relacionados com a presença de sítios específicos para componentes tóxicos em organismos sensíveis, já os fatores quantitativos determinam a concentração efetiva do agente citotóxico no sítio específico (STERGIOPOULOS et al., 2002).

Os fatores quantitativos que influenciam no acúmulo de substâncias tóxicas dentro da célula só foram descobertos nas últimas duas décadas e são descritos como membros da família de transportadores de membranas do tipo ABC e da Superfamília Facilitadora Principal (MFS). Estes transportadores apresentam substratos extremamente amplos, sendo capazes de transportar uma grande variedade de produtos tóxicos naturais ou sintéticos, de origem endógena ou exógena. Desta forma, evitam ou reduzem o acúmulo desses produtos no interior das células e conseqüentemente, evitam ou minimizam a sua ação tóxica (DEL SORBO et al., 2000).

Uma superexpressão de proteínas transportadoras do sistema ABC e MFS pode ocasionar um fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR). Este fenômeno permite que o transportador funcione como uma bomba de efluxo capaz de expelir da célula uma grande variedade de compostos tóxicos não similares quimicamente, sendo uma séria ameaça contra a eficácia de drogas (FLING et al., 1991; DEL SORBO et al., 2000). Ao longo dos últimos anos, o uso generalizado de compostos antifúngicos resultou no desenvolvimento de resistência em várias espécies de fungos. Um grupo de fungicida comumente usado na agricultura são os azóis, que atuam na desmetilação dos esteróis. Sendo assim os fungos desenvolveram mecanismos de resistência, por meio do efluxo dos agentes desmetilantes, por meio de transportadores MFS e passaram a ter uma afinidade reduzida pelo fungicida (HAMAMOTO et al., 2000). Mecanismos MDR também foram observados no fitopatógeno *Botrytis cinerea*, agente causal da podridão cinzenta, onde este evento resulta na seleção de populações resistentes, gerando grandes perdas econômicas (KRETSCHMER et al., 2009).

O fenômeno MDR é bastante comum em fungos patógenos humanos como *Candida albicans*, onde a grande exposição a compostos antifúngicos de uso clínico favorecem o aumento de populações resistentes, representando riscos para a saúde humana (KAPOOR et al., 2010).

Os transportadores MFS compõem a família mais abrangente de proteínas de membrana, presentes nos três domínios da vida. Eles facilitam o transporte uniporte, simporte ou antiporte de vários compostos, utilizando energia do gradiente eletroquímico através das membranas, sendo por este motivo, classificados como sistema de transporte secundário (PAULSEN et al., 1996; PAO et al., 1998; LAW et al., 2008).

De acordo com Saier et al. (2000), dentro da superfamília MFS estão incluídas 28 famílias de transportadores. Dezesesseis dessas famílias foram reconhecidas em 1998 (PAO et al., 1998). Cada família MFS inclui membros que em geral são específicos para uma classe de compostos diferentes. Assim, das 28 famílias estabelecidas, três apresentam especificidade por drogas e outras substâncias hidrofóbicas, oito são transportadores de açúcares e seus derivados, 11 famílias geralmente são específicas para ânions orgânicos e inorgânicos, duas estão relacionadas com o transporte de organo cátions, uma é específica para o transporte de complexos ferro-sideróforo, uma é específica para o transporte de peptídeos e três são de especificidade desconhecida.

As proteínas MFS estão provavelmente entre as mais antigas famílias de proteínas. Supostamente todas as formas de vida atuais que apresentam estas proteínas tiveram um progenitor procariótico a aproximadamente 3,5 bilhões de anos que apresentava seis domínios transmembrânicos (DTMs), que após uma duplicação gênica em *tandem*, passou a apresentar doze domínios transmembrânicos (SAIER, 1996).

Em geral, os transportadores MFS consistem de 12 ou 14 DTMs, conectados por *loops* hidrofílicos, com suas porções C-terminal e N-terminal localizadas no citoplasma. Os DTMs encontram-se organizados em duas metades homólogas, unidas por um grande *loop* entre o DTM 6 e 7. Semelhanças entre as duas metades das proteínas sugere que os transportadores MFS com 12 DTMs evoluíram a partir de um evento de duplicação de um gene que codifica uma proteína com 6 DTMs, enquanto os transportadores com 14 DTMs surgiram por meio da aquisição adicional de 2 DMTs no domínio C-terminal da proteína. Das 28 famílias de transportadores MFS, três apresentam 14 DTMs (PAO et al., 1998, YIN et al., 2006).

Análise mutacional com relação à funcionalidade dos dois domínios dessas proteínas sugere que o domínio N-terminal está envolvido principalmente na translocação de prótons,

enquanto o domínio C-terminal está envolvido na ligação e reconhecimento do substrato (GRIFFITH et al., 1992).

A partir do alinhamento de sequências de aminoácidos de transportadores MFS foi possível identificar a presença de um motivo conservado de 13 aminoácidos entre os DTMs 2 e 3 [G-[RKPTY]-L-[GAS] - [DN] - [RK] - [FY]-G-R - [RK] - [RKP] - [LIVGST] - [LIM]]. Acredita-se, que este motivo possa estar envolvido na promoção de mudanças conformacionais na proteína sobre substrato de ligação, permitindo que ocorra o tráfico de substratos através da membrana. O motivo também pode estar relacionado com a regulação do transporte de substrato para o citoplasma. Estudos mais recentes sobre a identificação e funcionalidade de importantes resíduos das proteínas MFS, revelam que a conservação destes está fortemente relacionada ao reconhecimento e translocação de substratos específicos, enquanto um outro conjunto de resíduos conservados está relacionado com a manutenção da estrutura da proteína. Estes encontram-se na cavidade central da mesma e apresentam uma taxa de evolução mais lenta (PAO et al., 1998; JOUHYUN et al., 2009).

Proteínas MFS apresentam de 400-600 aminoácidos, e análises de sua estrutura primária revelam que dentro de uma única família de transportadores encontram-se sequências com grande similaridade. Em contraste, em nível de superfamília, membros individuais de transportadores MFS compartilham baixa identidade ou similaridade em suas sequências, e são unidas apenas por domínios altamente conservados presentes em toda superfamília MFS. Embora exista uma divergência na sequência das proteínas MFS, estas compartilham a estrutura tridimensional (LAW et al., 2008).

Embora a análise funcional da maioria dos transportadores MFS ainda esteja em seus estágios iniciais, relatos sugerem que a função e a especificidade de substrato destas proteínas possa ser impressionantemente amplo. Transportadores MFS estão envolvidos no tráfico de açúcares, drogas, polióis, vitaminas, neurotransmissores, derivados do ciclo de Krebs, intermediários fosforilados da via glicolítica, aminoácidos, peptídeos, ferro-sideróforos, nucleosídeos, ânions e cátions orgânicos e inorgânicos. Desta forma, eles facilitam funções celulares, tais como a absorção de nutrientes, secreção de metabólitos do ciclo celular, proteção contra compostos tóxicos endógenos e exógenos, e manutenção de um gradiente eletroquímico através das membranas. Eles também estão envolvidos na esporulação de fungos e leveduras, comunicação celular e patogenicidade (STERGIOPOULOS et al., 2002).

Embora os componentes da superfamília MFS apresentem uma imensa variedade em suas sequências, estudos baseados exclusivamente na similaridade dessas proteínas sugerem

uma classificação de acordo com as relações filogenéticas, onde todos os membros conhecidos encontram-se divididos dentro de 28 famílias já citadas anteriormente. A classificação filogenética de proteínas MFS em famílias revelou uma estreita relação entre a estrutura e função. Assim, os membros de diferentes famílias têm especificidade de substrato específico e previsões sobre a função dos novos membros de uma família específica podem ser feitas (PAULSEN et al., 1996; PAO et al., 1998; SAIER, et al., 2000).

A este respeito, os transportadores de açúcares e drogas constituem, de longe, a maior família. Por exemplo, a anotação do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* revelou 186 transportadores MFS. Um total de vinte e oito dessas proteínas podem desempenhar papéis essenciais em fenótipos de múltipla resistência a drogas, enquanto 34 foram classificados como transportadores de açúcar (NELISSEN et al., 1997; SAIER, et al., 2000).

No fungo filamentoso *Neurospora crassa*, o transporte de glicose é realizado por meio do produto do gene *rco-3*, pertencente à superfamília MFS. Este gene apresenta uma sequência aberta de leitura (ORF) composta de 530 nucleotídeos, sendo interrompida por dois íntrons, o primeiro com 188 e o segundo com 62 nucleotídeos. A partir do alinhamento dessa sequência com outras que codificam proteínas transportadoras em fungos, foi possível identificar a presença de 12 domínios de membrana altamente conservados. Com a obtenção de mutantes para o gene *rco-3*, foi possível observar que este gene está relacionado com o transporte do carbono e no controle fisiológico da conidiação de *N. crassa* (MADI et al., 1997).

Entre outros exemplos podemos citar o fitopatógeno *Ustilago maydis*, um fungo biotrófico que requer o carbono orgânico do seu hospedeiro para o seu desenvolvimento. Um gene codificador de uma proteína MFS transportadora de açúcar com 12 DTMs foi caracterizado como um fator de virulência neste fungo, pois é expresso exclusivamente após a infecção do tecido vegetal. Mutantes para este gene mostraram uma drástica redução na patogenicidade, corroborando com a hipótese que este gene não está somente relacionado com a aquisição de carbono pelo patógeno, mas também está ligado com outros mecanismos que previnem a indução da defesa da planta infectada (WAHL et al., 2010).

Transportadores MFS podem estar envolvidos na secreção de toxinas hospedeiro específicas, tal capacidade foi relatada primeiramente por Pitkin et al. (1996). Estes pesquisadores descobriram que o gene TOXA de *Cochliobolus carbonum*, codifica um transportador MFS com 12 DTMs, que secreta a toxina hospedeiro-específica HC – Tetrapeptídeo específica. Curiosamente, o gene TOXA ocorre em duas cópias ligadas

acompanhada do gene HTS1 que codifica a enzima central na biossíntese HC-toxina, o que demonstra que estes genes estão agrupados em um *cluster* responsável pela produção de HC-toxina. O Gene TOXA só foi encontrado em cepas fúngicas que produzem HC-toxina. Mutantes com única cópia do TOXA interrompido ainda produzem a HC-toxina e é virulento ao milho. No entanto, as tentativas de interromper as duas cópias do gene TOXA foram infrutíferas, sugerindo que a proteína seja codificada em auto-defesa contra o HC-toxina. Assim, TOXA é essencial para a sobrevivência e virulência em plantas hospedeiras do HC-toxina.

Muitas espécies de fungos do gênero *Cercospora spp.*, incluindo um patógeno da soja *Cercospora kikuchii*, produzem o composto fitotóxico denominado cercosporina. Estes fungos apresentam um gene que codifica uma proteína transportadora de cercosporina com 14 DTMs chamado CFP (*Cercosporin Facilitator Protein*). Mutantes deste gene reduziram à virulência em soja, mostrando um significativo aumento da sensibilidade a cercosporina. Esses resultados indicam que CFP é um transportador de cercosporina, estando envolvido na virulência e na proteção do fungo contra a toxina produzida por ele mesmo (CALLAHAN et al., 1999; UPCHURCH et al., 2001).

Transportadores MFS responsáveis pelo transporte de cercosporina, também foram encontrados no fitopatógeno *Cercospora nicotianae*, este transportador com 12 DTMs quando interrompido, conferiu ao fungo novas características fenotípicas, incluindo uma drástica redução no acúmulo de cercosporina, diminuição na virulência do fungo e aumento na susceptibilidade a cercosporina exógena (CHOQUER et al., 2007).

Transportadores MFS podem estar envolvidos também na secreção de micotoxinas. A maioria dos genes envolvidos na biossíntese de tricotecenos por *Fusarium spp.*, estão localizados dentro de um *cluster* de genes. Em *Fusarium sporotrichioides*, este conjunto inclui *Tri12* um gene que codifica um transportador MFS com 14 DTMs. Mutantes de *S. cerevisiae* transformados com *Tri12* diminuíram a sensibilidade para tricotecenos, mostrando que o transportador *Tri12* desempenha um papel de auto-proteção em *F. sporotrichioides* contra tricotecenos (ALEXANDER et al., 1999).

O gene *aflT*, um transportador MFS de *Aspergillus flavus* foi identificado em um *cluster* de genes envolvidos na biossíntese de aflatoxina. A proteína codificada pelo gene *aflT* é altamente homóloga à HC-toxina, proteína transportadora TOXA de *Cochliobolus carbonum*. Estas observações sugerem que *aflT* codifica um transportador de drogas específico para aflatoxina (CHANG et al. 1999).

Transportadores MFS com outras funções foram identificados em *Botrytis cinerea*, tais genes foram denominados de *Bcmfs1*, *Bcmfs2* e *Bcmfs4*. Neste sentido, *Bcmfs1* codifica uma proteína com 14 DTMs, o que tem maior homologia para os transportadores MFS *Apaf11* de *Aspergillus parasiticus*, *CFP1* de *C. kikuchii*, e *TOXA* de *C. carbonum*. O gene *bcmfs1*, que codifica para um transportador de membrana MFS, está envolvido com mecanismos de tolerância frente a compostos tóxicos produzidos por outros fungos como camptotecina e cercosporina e ainda fungicidas. Estes transportadores podem ainda estar envolvidos na autoproteção dos micro-organismos produtores frente às toxinas por eles mesmos produzidas, como em *Aspergillus flavus* que produz aflatoxina (HAYASHI et al., 2002).

Em muitos casos, os transportadores MFS de fungos envolvidos com toxinas específicas estão localizados em conjuntos de genes responsáveis pela biossíntese desses produtos. No entanto, não se trata de uma regra visto que o gene *smt* que codifica um transportador MFS de *Gibberella fujikuroi*, que está localizada adjacente aos genes envolvidos na via biossintética de giberelina (GA), mas não estão envolvidos na secreção de GAs a partir deste fungo. O gene *smt* é provavelmente um membro de família de transportadores de açúcar, sendo a expressão desse gene induzida por álcoois de açúcar, como o sorbitol, manitol, e mioinositol (VOSS et al., 2001).

O isolamento e caracterização de um gene codificador de uma proteína MFS com 12 DTMs em *C. lindemuthianum* foi realizado por Santos (2010), após a clonagem e sequenciamento de um fragmento de 6,5 kb. Neste trabalho verificou-se que a proteína constituída por 541 aminoácidos codificada por este gene apresenta homologia com outros transportadores da família SP (*Sugar Porter*). Um exemplo da relação de transportadores MFS com a patogenicidade em fungos fitopatógenos foi relatada por Soares (2007) com a caracterização de um gene que codifica para uma proteína putativa de 539 aminoácidos da superfamília MFS em *C. lindemuthianum*. Esta caracterização foi realizada após a inativação de genes com a aplicação da técnica de REMI (integração mediada por enzimas de restrição) e posterior triagem nos mutantes obtidos que apresentavam deficiência na infecção do feijoeiro. Resultados como este, evidenciam a importância de estudos com transportadores MFS no sentido de ampliar os conhecimentos destas proteínas em fitopatógenos e por fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias no controle da antracnose no feijoeiro.

A partir de todas as informações supracitadas sobre transportadores MFS pode-se verificar que em fitopatógenos ainda há uma escassez de informações sobre a estrutura e função destas proteínas nestes organismos, o que justifica novos estudos com estas proteínas.

2.5. Estudo da função de genes

O isolamento de um gene não permite a atribuição imediata da função do mesmo. No entanto, muitas vezes, de posse dessas sequências, é possível recorrer às análises computacionais, onde a similaridade entre as sequências depositadas nos bancos de dados permite inferir a funcionalidade de um gene. Porém, a maioria das informações disponíveis sobre a função desses genes anotados nos bancos de dados é inteiramente especulativa sem nenhuma comprovação *in vivo*. Para identificar a função de um gene, uma das melhores estratégias consiste no estudo de organismos mutantes, que possuam a expressão desse gene alterada. Numerosas ferramentas moleculares têm sido usadas para estudo da função de genes em fungos, entre estas, destacam-se as técnicas de interrupção de genes, como a mutagênese direcionada por recombinação homóloga e mutagênese aleatória, e recentemente o silenciamento da expressão de um gene por RNA de interferência (KIM, 2001).

A técnica de *Split-marker* é uma estratégia de inativação do gene alvo por meio da inserção de um cassete de genes contendo um marcador de seleção. Esta técnica é baseada em duas rodadas da reação da polimerase em cadeia (PCR), onde quatro oligonucleotídeos universais são utilizados para o marcador de seleção e quatro oligonucleotídeos gene específicos são necessários para cada supressão. A inativação do gene alvo e a substituição por um marcador intacto é realizada a partir da recombinação homóloga entre as regiões de sobreposição de um gene marcador de seleção e entre as regiões flangeadoras do gene alvo. Esta técnica foi utilizada com sucesso por Catlett et al. (2003), mostrando alta eficiência na deleção de numerosos genes em espécies pertencentes ao filo Ascomycota, tais como *Cochliobolus heterostrofus* e *Gibberella zeae*.

A técnica de *Split-marker* foi utilizada para a interrupção de cinco genes diferentes em *Cryptococcus neoformans*. Após a transformação deste fungo, foi observada uma alta taxa de integrações homólogas (60%), sugerindo que esta técnica possa ser eficiente na manipulação molecular de *Cryptococcus neoformans*, que apresentou uma alta taxa de integrações ectópicas e telomerização em outras técnicas de interrupção gênica (FU et al., 2006).

A eficiência da técnica de *Split-marker* na prevenção de integrações ectópicas foi comprovada por Colot et al. (2006), em trabalhos realizados com o fungo filamentoso *N. crassa*, com o objetivo de interromper um grupo de genes que codificam fatores de transcrição e posteriormente analisar seus fenótipos. Em tal trabalho foi obtido 44% de transformantes por substituição, dos quais 68% estavam livres de integrações ectópicas.

Sendo assim a técnica de *Split-marker* torna-se uma grande aliada no estudo da função do gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*, agente causal da antracnose no feijoeiro comum.

Estudos sobre a funcionalidade de genes, principalmente em micro-organismos patogênicos podem fornecer subsídios para a compreensão do sistema de interação patógeno-hospedeiro, imprescindível ao estabelecimento da doença e ainda aumentar as informações sobre as funções das proteínas-alvo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

3. 1. Micro-organismos e condições de cultivo

O fungo *C. lindemuthianum*, isolado LV49 (raça 89), gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Molecular de Plantas, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, foi utilizado como linhagem selvagem durante o experimento. A linhagem selvagem, juntamente com os transformantes obtidos foram mantidos em meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) pH 6,8 a 22 °C. Para estocagem a longo tempo, as culturas de *C. lindemuthianum* foram conservadas como uma suspensão concentrada de conídios (10^8 conídios/mL) em glicerol 25 % e estocados à -80 °C.

Para a propagação de plasmídeos, foi utilizada a linhagem bacteriana de *Escherichia coli* DH5 α , pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, à qual encontrava-se estocada à -80 °C em glicerol 40 %. Quando necessário, a cultura estoque foi ativada à 37 °C por esgotamento em meio de cultura LB (Luria-Bertani) sólido.

3. 2. Sequência do gene *mfs1* e análise da região flanqueadora 3'

O isolamento e a caracterização do gene *mfs1* que codifica um transportador putativo de membrana da Superfamília MFS, foi realizado por Santos (2010) a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum* LV 49 (raça 81) construído por Soares (2007). Para este isolamento foi utilizada uma sonda homóloga de DNA de 408 pb, que representava uma sequência parcial de um transportador MFS, isolada por Oliveira et al. (2006).

A sequência completa de nucleotídeos do gene *mfs1* foi depositada no GenBank com o número de acesso HQ541322. Para caracterizar a região flanqueadora 3' do gene *mfs1*, uma sequência de nucleotídeos obtida a partir do seqüenciamento de um fragmento de DNA de 6,5 kb onde estava o gene *mfs1* foi analisada utilizando ferramentas como o BLASTP (NCBI) e Expaty. O resultado desta análise nos permitiu inferir sobre o agrupamento de genes com funções relacionadas, como já relatado para outros genes que codificam proteínas transportadoras de membrana em fungos e bactérias.

3. 3. Organização do gene *mfs1* no genoma de *C. lindemuthianum*

A organização e o número de cópias do gene *mfs1* no genoma de *C. lindemuthianum*, foram investigados inicialmente para posteriormente se proceder à inativação do gene. Para esta análise o DNA total do fungo foi extraído, clivado, e os fragmentos de DNA obtidos foram posteriormente detectados pela técnica de *Southern Blotting* (SAMBROOK et al., 2001).

3. 3. 1. Obtenção de massa micelial

Para obtenção de massa micelial da linhagem selvagem, fragmentos do micélio foram transferidos para tubos de ensaio contendo vagem de feijão fixadas em ágar-água previamente esterilizados, e incubados a 22 °C durante 14 dias (SILVA et al., 2007). Após a esporulação, uma suspensão com aproximadamente 10^7 conídios/mL foi preparada em solução de Tween 80 20 %, sendo posteriormente inoculada em placas de Petri contendo 25 mL de meio GPYECH líquido (ANSARI et al., 2004). As placas foram incubadas em câmara de crescimento por aproximadamente sete dias à temperatura de 22 °C. Em seguida, o micélio foi coletado, lavado com água destilada, congelado em nitrogênio líquido e mantido a - 80 °C até sua utilização.

3. 3. 2. Extração do DNA total de *C. lindemuthianum*

A extração de DNA total foi realizada segundo SPECHT et al. (1982) com modificações. Os micélios congelados foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção um pó fino. Com o auxílio de uma espátula, aproximadamente 400 mg do macerado foi transferido para dois microtubos de 1,5 mL contendo 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM; SDS 2 %) e mantidos no banho-maria a 70 °C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 350 µL de acetato de potássio 5M e procedeu-se à incubação no gelo durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outros tubos de 1,5 mL e acrescido de igual volume de fenol-clorofórmio 1:1. As amostras foram deixadas no gelo, sendo agitadas alternadamente durante 5 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 15000 g por 10 minutos, sendo a fase aquosa cuidadosamente coletada e transferida a outros tubos de 1,5 mL, previamente resfriados. Posteriormente, foi adicionado igual volume de clorofórmio e repetiu-se o procedimento realizado com o fenol-clorofórmio. À fase aquosa foram acrescidos 0,2 M de NaCl e um volume de isopropanol à temperatura ambiente. As

amostras foram deixadas por duas horas a -20 °C, sendo posteriormente centrifugadas a 15000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 100 µL de etanol 70 %, e deixado secar à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspenso em TE. Os tubos contendo DNA foram armazenados a - 20 °C.

3. 3. 3. Clivagem do DNA total de *C. lindemuthianum*

O DNA total extraído do fungo foi clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Not*I, *Xba*I que não apresentam sítios de restrição no fragmento de DNA utilizado como sonda, e *Hind*III, que apresenta um único sítio de restrição no fragmento correspondente à sonda. As reações de clivagem foram constituídas do DNA do fungo (5 µg), tampão da enzima (10X), enzima (10 U/ µL) e água ultrapura autoclavada para completar o volume de 40 µL. Essas reações foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 12 horas. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, juntamente com os marcadores de tamanho, ϕ X174/*Hae*III e o fago λ clivado com *Hind*III.

3. 3 . 4. Obtenção da membrana para hibridização

Após a separação dos fragmentos de DNA obtidos por clivagem (item 3. 3. 3.), o gel foi submerso em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) e posteriormente em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,0, NaCl 1,5 M) sendo cada tratamento realizado por uma hora, sob agitação branda. Logo em seguida, o gel foi depositado no aparato de transferência para a membrana de náilon (*Hybond- N⁺ Amersham Biosciences*®) por capilaridade em SSC 20X (Citrato de Sódio 0,3 M, NaCl 3M) (SAMBROOK et al., 2001) por um período de 12 horas. Ao final da transferência o DNA foi fixado à membrana com o aparelho UV *Crosslinker* UVC 500, Roeser.

3. 3. 5. Obtenção e marcação da sonda

A hibridização foi realizada utilizando uma sonda homóloga de 408 pb (sonda 1), que representa a sequência parcial de um gene que codifica um transportador de membrana MFS, isolada por Oliveira et al. (2006). A sonda foi marcada com o Kit PCR *Dig Probe Synthesis* (Roche®) seguindo as instruções do fabricante, utilizando os oligonucleotídeos MFS1L e MFS1R mostrados na Tabela 1. O seguinte programa de PCR foi utilizado: Desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, com um passo de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência (5'- 3')	Finalidade
MFS1L MFS1R	GAGCTCTGGAACACCCACTC AAGGCTATGGTGGTG TTTGC	Sonda 1
NLC37 NLC38	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	<i>Split-Marker</i>
M13R M13F	AGCGGATAACAATTTACACAGGA CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	<i>Split-Marker</i>
FP1 RP1	GCATCGTCTTTGCCATGTAA TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTAGCTGTACGATTGGGTGGTC	<i>Split-Marker</i> Sonda 2
FP2 RP2	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTAGATGCGCATGTGCTTACC GCGCTAAACACTTCTCCAG	<i>Split-Marker</i>
CIF CIR	GTGCCCTCAATGGCTATGAC TTCAAGCCGGTTTTTCTTTG	Controle de inativação
HPH1 HPH2	CAGCGAGAGCCTGACCTATTG GCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC	Sonda 3
FT1L FT1R	CATTCTCGAGGGCGTGCT AGCATCCACATGAGGTACGG	Fator de transcrição

3. 3. 6. Condições de hibridização

A hibridização foi realizada com o kit *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche®). A sonda utilizada na hibridização foi desnaturada e rapidamente resfriada no gelo, antes de ser adicionada à solução de hibridização previamente aquecida à 37 °C. A membrana foi exposta a uma solução de pré-hibridização por 30 minutos sob agitação suave, em seguida esta solução foi descartada, sendo então adicionada à membrana a solução de hibridização contendo a sonda desnaturada.

A hibridização foi conduzida em condições de alta estrigência, à temperatura de 43 °C (calculada de acordo com as instruções do fabricante) durante aproximadamente 12 horas. As lavagens pós- hibridizações foram feitas com SSC 2X, SDS 0,1% por 5 minutos, SSC 0,5X, SDS 0,1% por 5 minutos, ambas à temperatura ambiente. Posteriormente novas lavagens foram realizadas com SSC 0,5X, SDS 0,1% por 15 minutos a 65 °C e com SSC 0,1X, SDS 0,1% por mais 15 minutos a 65 °C. Todo processo de detecção foi feito conforme

as instruções do fabricante e as membranas foram expostas ao filme de Raio X BioMax Light Film (Kodak®) e este revelado após 30 minutos de exposição.

3. 4. Inativação do gene *mfs1*

O mutante $\Delta mfs1$ de *C. lindemuthianum* raça 89 foi obtido por meio da metodologia de *Split-Marker* descrita inicialmente por Catlett et al. (2003).

A técnica de *Split-Marker* foi executada a partir de duas rodadas de PCR, utilizando quatro oligonucleotídeos universais para o marcador de seleção de resistência à higromicina (M13R, M13F, NLC37 e NLC38), e quatro oligonucleotídeos específicos para o gene *mfs1* (FP1, RP1, FP2 e RP2) mostrados na Tabela 1.

Para execução da técnica os oligonucleotídeos gene específicos foram construídos com o auxílio do programa PRIMER 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). A partir de cada fragmento de DNA foram desenhados oligonucleotídeos (F e R) que amplificam um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pb. Foi acrescentado à extremidade 5' dos oligonucleotídeos RP1 e FP2 uma sequência flanqueadora com 24 pb que apresenta complementariedade aos oligonucleotídeos universais M13R e M13F, respectivamente.

Os fragmentos de DNA do cassette de higromicina fosfotransferase (HYG) “HY” e “YG” foram amplificados a partir do plasmídeo pAN7.1 (PUNT et al., 1987) usando os oligonucleotídeos M13R /NLC37 e M13F/NLC38 respectivamente. As reações de PCR foram realizadas com a enzima Go *Taq* DNA polimerase (*Promega*®), conforme as instruções do fabricante. As amplificações foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 55 e 60 °C para os programas que usam os oligonucleotídeos M13R /NLC37 e M13F/NLC38 respectivamente por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, depois uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. As regiões específicas do gene *mfs1* foram amplificadas a partir do DNA total de *C. lindemuthianum* usando os oligonucleotídeos iniciadores FP1/RP1 e FP2/RP2 em um programa com desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 59,7 °C por 1 minuto e 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Para realizar a segunda rodada de PCR, os moldes utilizados foram os produtos das reações de PCR anteriores e os oligonucleotídeos FP1/NLC37 e RP2/NLC38. As amplificações foram realizadas com a enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante, em um termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 55 e 58 °C por 45 segundos e 68 °C por 4 minutos e 30 segundos, e uma extensão final de 68 °C por 7 minutos (Figura 1).

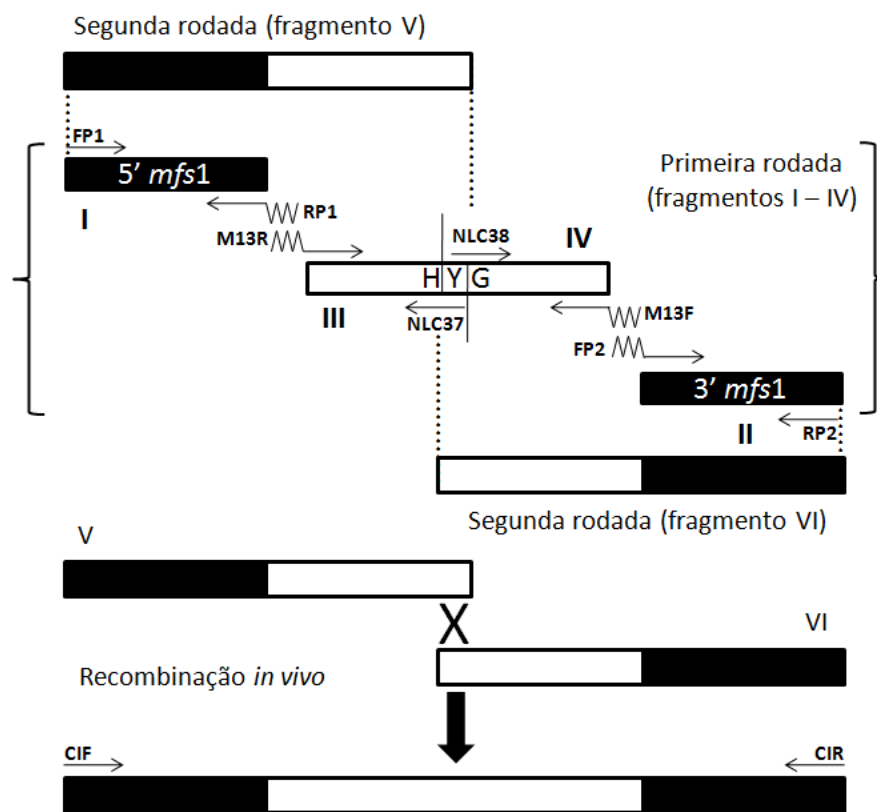


Figura 1. Estratégia de inativação gênica pela técnica de *Split-Marker*. Os retângulos sem preenchimento representam os fragmentos de DNA que correspondem ao cassete de resistência à higromicina presente no plasmídeo pAN7-1. Os retângulos preenchidos (preto) representam os fragmentos de DNA referentes ao gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*. A primeira etapa da técnica de *Split-Marker* recebe destaque no esquema, onde são evidenciados todos os oligonucleotídeos utilizados, assim como os fragmentos de DNA gerados por quatro reações de PCR independentes, que foram utilizados na etapa seguinte. A segunda etapa da técnica consistiu em duas reações de PCR independentes, gerando os fragmentos de DNA V e IV que foram utilizados na transformação de *C. lindemuthianum*. A recombinação específica dos fragmentos de DNA com o gene *mfs1* de *C. lindemuthianum* selvagem recebe destaque, com o esquema do mesmo gene interrompido pelo cassete da higromicina fosfotransferase, obtidos após a transformação e confirmados por uma nova PCR, com os oligonucleotídeos CIF e CIR.

3. 5. Transformação de *C. lindemuthianum*

A transformação foi realizada com os cassetes de inativação construídos como descrito no item 3.4. O fungo *C. lindemuthianum* (raça 89) foi cultivado por dez dias em vagem estéril, visando uma maior produção de esporos. Aproximadamente 1×10^6 conídios/mL foram inoculados em meio GPYECH (20g de glicose, 5g de peptona, 1g de extrato de levedura e 1g de caseína hidrolizada L^{-1}) mantidos a 22 °C durante cinco dias. Após o crescimento, o micélio foi lavado com água destilada e colocado em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL do tampão fosfato suplementado com 7 mg/mL de *Lysing Enzyme* (Sigma) e 15 mg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA). A protoplastização foi feita a 30 °C sob agitação de 80 rpm durante 3-4 horas. Os protoplastos obtidos foram lavados duas vezes em solução ST (Sorbitol 1M, Tris-HCl 100 mM pH 7,5) e uma vez em STC (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 100 mM pH 7,5, $CaCl_2$ 50 mM) por meio de centrifugações sucessivas a 3000 g, a 4 °C, durante 10 minutos e foram ressuspensos em 5 mL dessas soluções. Ao final das lavagens, os protoplastos foram centrifugados a 3000 g a 4 °C durante 10 minutos e ressuspensos em STC, resultando numa concentração de 10^7 protoplastos por mL. Neste contexto, à suspensão de protoplastos foi adicionado a solução de DNA contendo os fragmentos gerados a partir da técnica de *Split-Marker*, e 50 μ L de solução de polietilenoglicol (PEG 6000 25 %, $CaCl_2$ 50 mM) e incubados a 0 °C durante 20 minutos. Posteriormente foram acrescentados mais 500 μ L de solução de PEG e o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Ao final desse período, os protoplastos foram plaqueados pelo método de *Pour Plate* em meio BDA contendo sacarose 0,56 M que funciona como um estabilizador osmótico para regeneração dos protoplastos. As placas foram incubadas a 22 °C durante 24 horas. Após a regeneração dos protoplastos, 5 mL de meio BDA semi-sólido contendo higromicina (Sigma-Aldrich) foram adicionados sobre o meio de cultura de cada placa de transformação (concentração final de higromicina de 60 μ g/mL). As placas foram incubadas, novamente, a 22 °C até o aparecimento das colônias transformantes.

Os transformantes resistentes à higromicina foram selecionados e purificados por meio do isolamento monospórico.

3. 6. Estabilidade mitótica dos transformantes

Para avaliar a estabilidade mitótica dos transformantes, os mesmos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA sem antibiótico, e incubados por sete dias a 22 °C. Após este período os mesmos foram transferidos para outra placa contendo BDA, e assim sucessivamente por cinco gerações. Após as transferências seriadas, foi testada a capacidade de crescimento dos transformantes em meio BDA contendo 100 µg de higromicina/mL.

3. 7. Triagem dos transformantes com integração específica

Para selecionar um transformante com integração específica ao locus do gene *mfs1*, foi realizada uma reação de PCR, com oligonucleotídeos específicos (CIF e CIR, Tabela 1), que amplificam a partir das regiões flanqueadoras do gene *mfs1*. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, para a confirmação do genótipo mutante. As amplificações foram realizadas com a enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante, em um termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 59 °C por 45 segundos e 68 °C por 6 minutos e 30 segundos, e uma extensão final de 68 °C por 10 minutos.

3. 8. Caracterização molecular dos transformantes

Para caracterização molecular, os micélios dos transformantes obtidos e confirmados, juntamente com a linhagem selvagem, foram obtidos de acordo com o item 3.3.1, e em seguida procedeu-se a extração do DNA total das amostras seguindo o método supracitado no item 3. 3. 2.

As preparações de DNA dos fungos foram submetidas a clivagens por endonucleases de restrição, estas foram escolhidas de acordo com os sítios de restrição encontrados nas sequências do gene *mfs1* e *hyg*. As enzimas usadas foram: *SalI* (não apresenta sítio de reconhecimento no interior do gene *mfs1* resultando no DNA fúngico selvagem um fragmento de DNA de 6352 pb). A enzima *ScaI* foi utilizada para verificar a integração do gene *hyg* no genoma dos transformantes (apresenta dois sítios de reconhecimento flanqueando o gene *hyg*, gerando um fragmento de DNA de 1089 pb).

As reações de clivagem continham 5 µg do DNA do fungo, tampão da enzima (1X), endonuclease de restrição (10U) e água ultrapura autoclavada para completar um volume de 40 µL. Essas reações foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 12 horas. Os fragmentos

de DNA gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, juntamente com o marcador de tamanho DNA *Ladder Mix*, *Fermentas Life Sciences*®.

Desta forma foram preparados dois géis para subsequente transferência à membranas, e a hibridização foi feita com cada sonda de forma independente. A transferência para a membrana de náilon foi feita conforme descrito no item 3.3.4. Posteriormente, a hibridização foi feita com o kit *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (*Roche*®). A membrana obtida com as clivagens por *SalI* foi submetida à hibridização com a sonda de 760 pb (sonda 2) referente ao gene *mfs1*, amplificadas pelos oligonucleotídeos FP1 e RP1 (Tabela 1). Enquanto a membrana obtida com as clivagens por *ScaI* foi hibridizada com a sonda de 712 pb (sonda 3) referente ao gene de higromicina fosfotransferase presente no plasmídeo pAN7.1, amplificadas pelos oligonucleotídeos HPH1 e HPH2 (Tabela 2). As sondas foram marcadas em reações de PCR independentes com o Kit PCR *Dig Probe Synthesis* (*Roche*®) seguindo as instruções do fabricante. As hibridizações foram conduzidas em condições de alta stringência, à temperatura de 48 °C (calculada de acordo com as instruções do fabricante).

3. 9. Análise fenotípica do mutante $\Delta mfs1$

3. 9. 1. Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade do isolado selvagem e do mutante $\Delta mfs1$ com integração específica *mfs1* de *C.lindemuthianum* foi realizado, de acordo com o método previamente publicado por Dusfrene et al., 1998.

Sementes de feijão comum do cultivar Rosinha (susceptível) foram colocadas em papel Germ Test® umedecido com água destilada e germinadas em estufa úmida a 37 °C durante dois dias. Após este período, as sementes foram transplantadas para vasos e as plântulas crescidas em câmara de crescimento apropriada durante 10 dias. Posteriormente, as folhas de feijoeiro foram excisadas, e em sua superfície abaxial foi inoculada uma suspensão de 1×10^6 conídios por mL, obtida a partir do isolado LV 49 de *C. lindemuthianum* raça 89, e também do mutante $\Delta mfs1$. Para a obtenção destes conídios, o fungo foi repicado em tubos de ensaio contendo vagem de feijão fixadas em ágar-água previamente esterilizados, e incubados a 22 °C durante 10 dias (SILVA et al., 2007). Essas folhas inoculadas foram mantidas individualmente em placas de Petri forradas com discos de papel Germ Test® umedecidos em água ultrapura autoclavada e incubadas a uma temperatura de 22 °C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Ao longo de sete dias consecutivos, as folhas foram observadas e fotografadas a cada 24 horas, com o objetivo de representar todas as etapas do

processo de infecção por *C. lindemuthianum*. Um controle negativo foi realizado inoculando-se água ultrapura autoclavada na superfície abaxial de algumas folhas, sendo estas acompanhadas ao longo do processo.

3. 9. 2. Avaliação da sensibilidade micelial de *C. lindemuthianum* a diferentes fungicidas

O bioensaio foi realizado incorporando-se os fungicidas ao meio de cultura, adotando-se a técnica descrita por Edgington et al. (1971). A partir da solução estoque, procedeu-se a diluição em série, de tal maneira que cada mL dessa solução, quando adicionada a 99 mL de BDA fundido (45 °C – 50 °C), atingiu-se a concentração desejada. Após adicionar o fungicida ao meio de cultura, realizou-se a agitação para homogeneização do mesmo. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri. Discos de 6 mm de diâmetro do micélio do fungo selvagem e do mutante $\Delta mfs1$ foram colocados no centro das placas de Petri com os respectivos fungicidas. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, a 22 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. O componente ativo dos fungicidas, modo de ação e concentrações usadas encontram-se na Tabela 2. A escolha dos fungicidas foi baseada em sua utilização normalmente no controle de campo da antracnose do feijoeiro.

Tabela 2. Fungicidas utilizados nos bioensaios do controle *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* (raça 89) selvagem e mutante $\Delta mfs1$.

Nome comercial	Componente ativo	Tipo de ação	CCA*
Dithane	Mancozeb	Protetora	800 gKg ⁻¹
Folicur	Tebuconazole	Sistêmico	200 gL ⁻¹
Cobre Sandoz	Óxido Cuproso	Protetora	500 gKg ⁻¹

*Concentração do componente ativo.

O experimento foi realizado de forma independente com o fungo *C. lindemuthianum* selvagem e mutante $\Delta mfs1$ com 31 tratamentos, sendo cada parcela constituída por três placas de Petri. Os tratamentos foram feitos com os seguintes fungicidas: Dithane (mancozeb), Folicur (tebuconazole) e Cobre Sandoz (óxido cuproso) em cinco concentrações (1, 10, 100, 500, 1000 ppm) e o controle sem fungicida.

Os resultados foram avaliados medindo-se diariamente o diâmetro micelial, usando uma régua graduada em milímetros (mm), ao longo de 10 dias de incubação. O efeito dos diferentes tratamentos foram comparados segundo Teste de Tukey ao nível de 0,05 % de significância. Foi determinado também o índice de crescimento micelial e também a concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, o intervalo entre as concentrações dos fungicidas capaz de inibir totalmente o crescimento micelial do fungo.

$$\text{CMI} = \frac{\text{crescimento do controle} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento do controle}} \times 100$$

3. 9. 3. Avaliação do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em diferentes açúcares como fontes de carbono

Para investigar a funcionalidade do transportador Mfs1, culturas de *C. lindemuthianum* selvagem e também do mutante $\Delta mfs1$ foram cultivadas em placas contendo 25 mL de meio mínimo (MM) suplementado com diferentes açúcares como fontes de carbono, os reagentes utilizados foram obtidos de fabricantes com alto grau de pureza (glicose, frutose, xilose, manose, mioinositol, sorbitol, lactose e sacarose) em uma concentração de 5 %. Após a solidificação do meio, discos de 6 mm de diâmetro da colônia do fungo foram colocados no centro das placas de Petri. As placas foram incubadas durante 10 dias em câmara de crescimento, a 22 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Os resultados foram avaliados medindo-se diariamente o diâmetro micelial, usando uma régua graduada em milímetros (mm). O efeito dos diferentes tratamentos foram comparados segundo Teste de Tukey ao nível de 0,05 % de significância.

3. 9. 4. Avaliação da germinação de conídios de *C. lindemuthianum*

A germinação dos conídios dos isolados selvagem e do mutante $\Delta mfs1$ foi avaliada em suspensão com concentração de 5×10^5 esporos/ml adicionada ao meio GPYECH e MM suplementado com glicose e manose (5%). As lâminas escavadas contendo os conídios foram incubadas a 22 °C. Após 96 horas, as amostras foram observadas em microscópio óptico para avaliação da germinação.

3. 9. 5. Avaliação da conidiação de *C. lindemuthianum*

Para à avaliação da conidiação da linhagem selvagem e do mutante $\Delta mfs1$, fragmentos de micélio de mesma idade e de mesmo tamanho foram inseridos em tubos de ensaio contendo vagem de feijão fixadas em ágar-água previamente esterilizados, e incubados a 22 °C durante 15 dias. Foram preparados 10 tubos para cada linhagem.

3. 10. Análise filogenética do gene *mfs1*

Para a realização da análise filogenética, foi feita uma busca por sequências de aminoácidos de membros representativos de diferentes famílias de transportadores MFS, listados nas Tabelas 3 e 4. A busca de tais sequências foi feita no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). O programa MEGA 4.0 (TAMURA et. al., 2007) foi utilizado inicialmente para o alinhamento das sequências.

As árvores de Máxima Parcimônia (MP) foram construídas, sendo os testes realizados pelo programa PAUP * 4.0b10 (SWO VORD, 2002). O método de busca heurística escolhido para construção da árvore de foi o de bisseção e reconexão de árvores (TBR). Para avaliar a confiabilidade das árvores filogenéticas, foi aplicado um *bootstrap* de 1000.

Para visualização das árvores obtidas pelos métodos de Máxima parcimônia, foi utilizado o programa Tree View (PAGE, 1996).

Tabela 3. Espécies fúngicas, números de acesso no GenBank e família das proteínas transportadoras MFS, cujas sequências de aminoácidos foram utilizadas neste trabalho.

Espécie	Número de acesso	Família
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001391702.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_681809.1	IST (Transportador Ferro Sideróforo)
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	XP_001550120.1	
<i>Gibberella zeae</i>	XP_380715.1	
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Q00357.1	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AAF64435.2	DHA14 (Drogas H ⁺ Antiporter 14 DTMs*)
<i>Cercospora kikuchii</i>	AAC78076.1	
<i>Cercospora nicotianae</i>	ACD42873.1	
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	SOARES (2007)	
<i>Glomerella graminicola</i>	EFQ34170.1	DHA12 (Drogas H ⁺ Antiporter 12 DTMs)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_747804.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_658597.1	
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	HQ54132.2	
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001220480.1	SP (Transportador de açúcar)
<i>Neurospora crassa</i>	XP_964352.1	
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_369575.2	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002566754.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_658612.1	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	XP_001561284.1	NNP (Transportador de nitrito/nitrato)
<i>Glomerella graminicola</i>	EFQ26386.1	
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_001404223.1	
<i>Neurospora crassa</i>	CAD71077.1	
<i>Neurospora crassa</i>	AAA74899.1	
<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001262447.1	PHS (Fosfato H ⁺ Simporter)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BAA14358.1	
<i>Candida albicans</i>	EEQ42091.1	
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001223897.1	
<i>Ustilago maydis</i>	XP_761749.1	

*DMTs: Domínios transmembrânicos.

Tabela 4. Espécies fúngicas, números de acesso no GenBank e tipo de açúcares transportados por proteínas da família SP (*Sugar Porter*), cujas sequências de aminoácidos foram utilizadas neste trabalho.

Espécie	Número de acesso	Açúcar transportado
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	HQ54132.2	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_753203.1	
<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001259225.1	
<i>Glomerella graminicola</i>	EFQ25994.1	Hexoses indefinidas
<i>Neurospora crassa</i>	XP_964352.1	
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001220480.1	
<i>Aspergillus clavatus</i>	XP_001270350.1	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_747891.1	
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	XP_001937764.1	Lactose
<i>Aspergillus flavus</i>	XP_002383101.1	
<i>Neurospora crassa</i>	XP_959616.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_658742.1	
<i>Aspergillus oryzae</i>	XP_001825209.1	Quinato
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	XP_001547488.1	
<i>Neurospora crassa</i>	AAA99806.1	
<i>Glomerella graminicola</i>	CBA11545.1	
<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001220604.1	Glicose
<i>Podospora anserina</i>	XP_001912883.1	
<i>Sordaria macrospora</i>	CBI57503.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_660398.1	
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_363447.1	
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	XP_001555197.1	Frutose
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002563779.1	
<i>Aspergillus flavus</i>	XP_002378351.1	
<i>Ustilago maydis</i>	XP_761749.1	Grupo externo

4. RESULTADOS

4. 1. Sequência do gene *mfs1* e análise da região flanqueadora 3'

O gene *mfs1* com uma sequência codificadora de 1623 pb foi isolado e caracterizado por Santos (2010). Com o objetivo de verificar se este gene estava próximo de outro gene com função relacionada, o restante do fragmento de 6,5 Kb *SalI/SalI* onde o gene *mfs1* estava inserido, foi sequenciado e analisado. A região flanqueadora 3' foi analisada, sendo possível identificar além do gene *mfs1* uma sequência aberta de leitura (ORF) correspondente a um gene da superfamília de fatores de transcrição *zinc finger*, especificamente da família $Zn[II]_2Cys_6$, notavelmente, apenas encontrada em fungos. A Figura 2 mostra o mapa de restrição do fragmento de 6,5 Kb, a orientação dos genes *mfs1* e o gene putativo que codifica um fator de transcrição, denominado *ft1*.

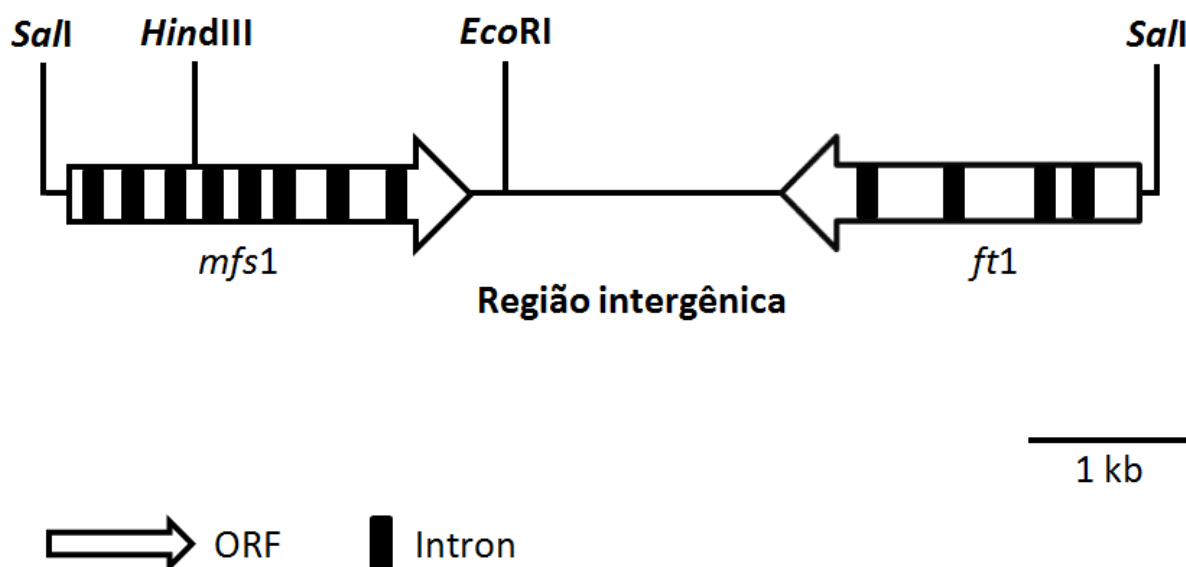


Figura 2. Mapa de restrição do fragmento de DNA de 6,5 Kb. O esquema representa as regiões que correspondem às janelas abertas de leitura dos genes putativos *mfs1* e *ft1*, com os seus respectivos íntrons. A barra à direita representa a escala de 1 kb. As setas indicam as ORFs e o sentido de transcrição dos genes *mfs1* e *ft1*, respectivamente.

A ORF do gene *ft1* é flanqueada por uma sequência 5' de 561 pb e por uma sequência 3' de 445 pb. A região promotora desse gene apresenta *cis* elementos putativos envolvidos no controle da sua expressão, como o elemento *TATA* box, *CAAT* box e ilhas de pirimidinas. Nas regiões promotoras de genes de organismos eucariotos, esses elementos podem atuar como sinais básicos para a transcrição, determinando, muitas vezes a eficiência do processo. Na região 3' não codificadora, foi encontrado a 323 pb *downstream* do códon de parada um sinal de poliadenilação ATAA, sequência tipicamente encontrada em fungos filamentosos.

A análise da sequência permitiu a identificação de uma proteína putativa contendo 634 aminoácidos, sendo, portanto codificada por uma ORF que apresenta 1905 pb. Na região codificadora foram identificados quatro possíveis íntrons com 41, 97, 17 e 78 pb e 5 éxons, que apresentam os tamanhos de 192, 636, 432, 402 e 243 pb. Sítios envolvidos no mecanismo de *splicing* foram encontrados flanqueando os 4 íntrons, sendo o sítio GT(A/G)NGT encontrado na extremidade 5' e o sítio (CT)AG na extremidade 3' (KUPFER et al., 2003) (Figura 3). A proteína deduzida apresenta uma massa molecular de aproximadamente 70 kDa.

Com o auxílio da ferramenta de busca por domínios conservados do NCBI, aliada à ferramenta BLASTP, foram encontrados domínios pertencentes à superfamília de fatores de transcrição. Foi observada também, a organização do gene *ft1* em diferentes genomas já sequenciados, sendo relatada a ocorrência de fatores de transcrição desta família agrupados a genes que codificam proteínas transportadoras MFS, como o gene *mfs1* (Figura 4).

Utilizando a sequência deduzida da proteína *ft1* foi realizada uma busca de sequências similares em bancos de dados, usando a ferramenta BLASTP na página do NCBI e também na página do BROAD Institute (<http://www.broadinstitute.org>). As espécies, assim como o número de acesso e similaridade com a sequência de *ft1* são especificadas na Tabela 5.

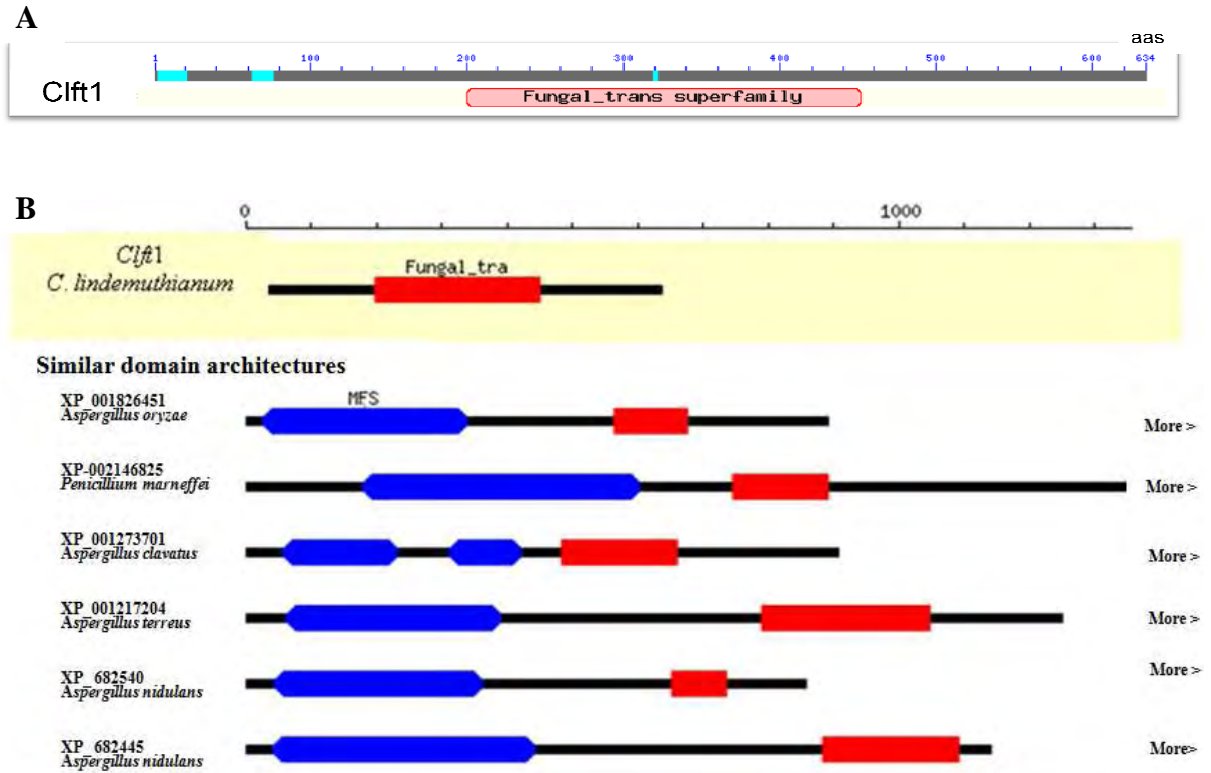


Figura 4. Família de reguladores transcricionais de fungos. (A) Domínio característico da superfamília de fatores de transcrição de fungos, Zn[II]₂Cys₆ *finger*. (B) Ocorrência de genes que codificam fatores de transcrição em fungos associados a genes que codificam proteínas transportadoras de membrana da família MFS em diferentes fungos do filo Ascomycota, como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Tabela 5. Espécies de fungos, números de acesso no GenBank e similaridade da proteína *ft1* com outras proteínas pertencentes à família de reguladores transcricionais de fungos filamentosos.

Espécie	Nº de Acesso	Banco de dados	Similaridade (%)
<i>Colletotrichum graminicola</i>	EFQ34883.1	GenBank	92
<i>Gibberella zeae</i>	XP_383447.1	GenBank	90
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002565376.1	GenBank	90
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_753204.1	GenBank	89
<i>Neurospora crassa</i>	XP_964351.1	GenBank	83
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_369573.2	GenBank	79
<i>Podospora anserina</i>	XP_001912721.1	GenBank	77
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_663412.1	GenBank	68
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	XP_001554307.1	GenBank	65

Com o objetivo de investigar a possível relação entre este fator de transcrição e o genes que codificam transportadores MFS, o promotor do gene *mfs1* foi analisado para verificar a presença de *cis* elementos de reconhecimento de proteínas reguladoras da família Zn[II]₂Cys₆ *finger* de fungos, cuja sequência é 5' CGG-N₂₋₃₀-CCG3'. Este elemento foi encontrado na posição -229 no promotor do gene *mfs1*. Outros *cis* elementos encontrados foram o de reconhecimento da proteína CreA (envolvida com repressão catabólica em fungos, 5'SYGGRG3') localizado a -204, sobreposto ao *cis* elemento de ligação para um fator de transcrição contendo o domínio Zn[II]₂Cys₆ *finger* e outro *cis* elemento para ligação da proteína PacC (5' GCCARG3'), envolvida no controle da expressão gênica de acordo com o pH do ambiente, foi detectado próximo ao ponto +1 da tradução, sendo detectado a - 13 (Figura 5). A partir desta análise podemos sugerir que o gene *mfs1* pode ser regulado pelo fator de transcrição Ft1, o que justifica a organização destes genes no genoma de *C. lindemuthianum*, além de poder ser regulado pelo pH ambiental e por fontes de carbono preferenciais no ambiente.

```

-381      tcgtcaatagtttccctggctagtgtgggcaaaacaagactcgaagcgcctcctgtgttgt
-321      tggtcgacgacctaccgagtacaggtcatctgtgtcaccgccaggtttttttcaaaccg
-261      ttcgtctggttggcatgatgatggcccgaatg cggggagagctcttgtctggatgggctg
-201      ggggtctcgaggccgcagcatttaaagagggctgcgttatcgccctctccatcttttcgt
-141      ctccatcgacggtcacggaaccatcccagactcgatctcgcccgcctctccacgtctct
-81      ccaactgtttcttgaccagtcggtccacttggtttgagactgtgtgtgtgtttggaaccgt
-21      atcttgct gccaaatcc cacaATG

```

Figura 5. Caracterização da região promotora do gene *mfs1*. A sequência destacada em amarelo e sublinhada nas extremidades corresponde ao *cis* elemento de ligação a proteínas de regulação transcricional contendo domínios *zinc finger*. A sequência em vermelho representa um possível *cis* elemento de reconhecimento de uma proteína *like* CreA e em verde o possível *cis* elemento de reconhecimento por uma proteína *like* PacC.

4. 2. Organização do gene *mfs1* no genoma de *C. lindemuthianum*

Na análise da organização do gene *mfs1* foi observado que este gene está presente em cópia única no genoma de *C. lindemuthianum* selvagem Raça 89 pois, um único fragmento de DNA específico foi constatado na análise do perfil de restrição quando foram usadas enzimas que não clivam dentro da sequência usada como sonda (Sonda 1), sendo que dois fragmentos de DNA foram observados quando o genoma do fungo foi clivado com a enzima *HindIII*, que apresenta um único sítio de reconhecimento no fragmento de DNA utilizado como sonda (Figura 6).

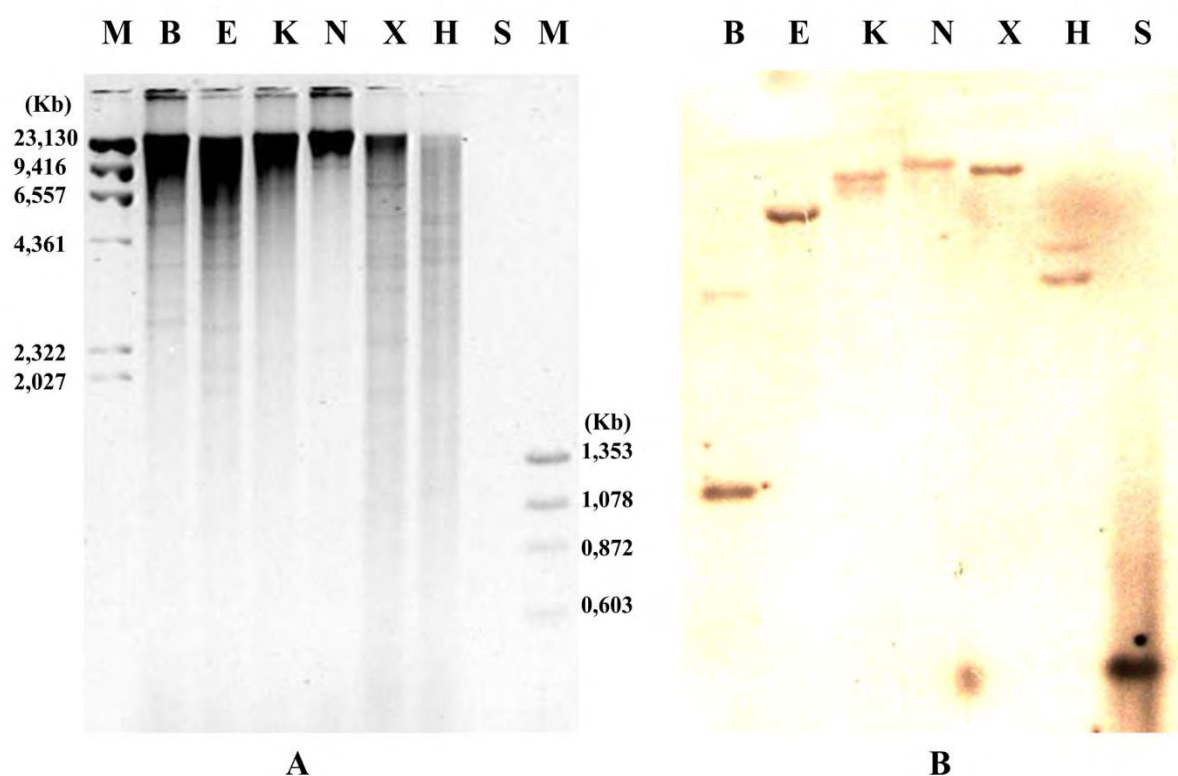


Figura 6. Organização do gene *mfs1* no genoma de *C. lindemuthianum* raça 89. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA de *C. lindemuthianum* submetido a clivagens com as endonucleases de restrição *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Kpn*I (K), *Not*I (N), *Xba*I (X), *Hind*III (H). Controle positivo: fragmento de DNA de 408 pb utilizado como sonda (S). (B) Auto-radiografia. (M) DNA do fago lambda digerido com a enzima *Hind*III e DNA do fago ØX174/*Hae*III.

4. 3. Inativação do gene *mfs1*

A função do gene *mfs1* foi avaliada por meio da estratégia de inativação gênica denominada *Split-marker*. Neste sentido, na primeira rodada de PCR, foi realizada utilizando-se o plasmídeo pAN7.1 como molde, e como produtos foram obtidos os fragmentos de DNA de 3101 e 1584 pb, amplificados pelos oligonucleotídeos M13R /NLC37 e M13F/NLC38, respectivamente, que representam a primeira rodada da PCR. Ainda nesta primeira rodada, utilizando-se o DNA genômico como molde, foram obtidos dois fragmentos de 761 e 608 pb, amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores FP1/RP1 e FP2/RP2, respectivamente. A segunda rodada de PCR teve como produtos dois fragmentos de DNA com 3862 e 2192 pb que foram utilizados para transformação de protoplastos de *C. lindemuthianum*. Os fragmentos de DNA obtidos pela técnica de *Split-Marker* podem ser observados na Figura 7.

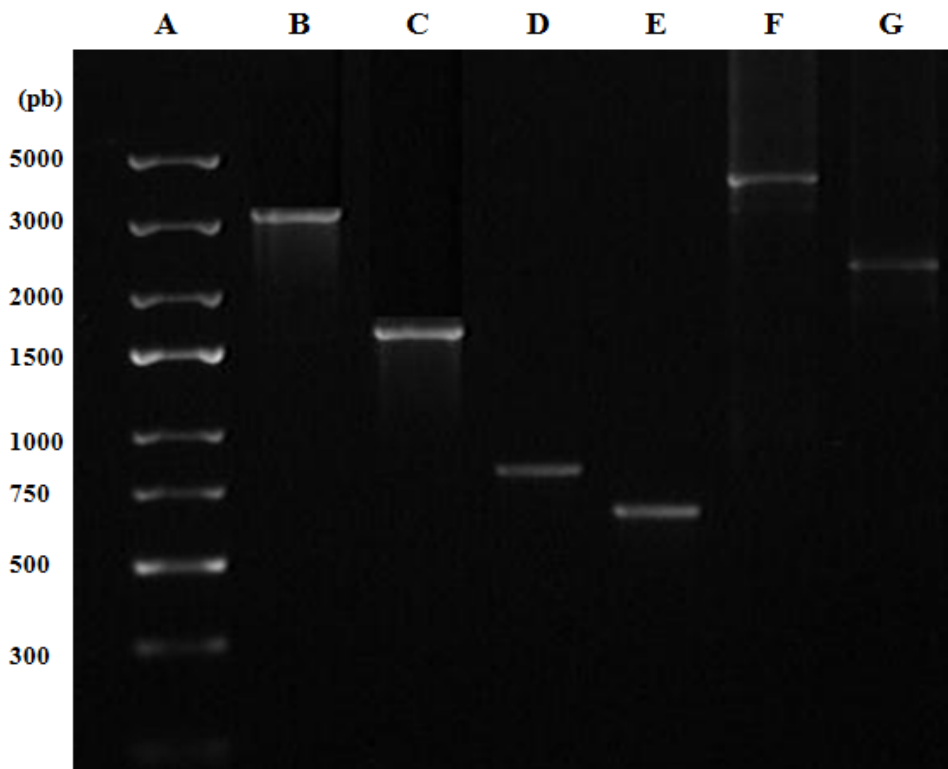


Figura 7. Confirmação dos fragmentos de DNA obtidos por PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. B e C – Fragmentos amplificados a partir do gene de resistência a higromicina presente no plasmídeo pAN7.1. D e E – Fragmentos amplificados a partir da região flanqueadora do gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*. F e G fragmentos finais da técnica de *Split-Marker*, F tem como molde os fragmentos presentes em B e D, enquanto G tem como molde os fragmentos presentes em C e E e o marcador de tamanho usado foi o *GeneRuler™ Express DNA Ladder* (A).

4.4. Transformação de protoplastos de *C. lindemuthianum*

Após a transformação dos protoplastos de *C. lindemuthianum* com os fragmentos de DNA obtidos por PCR foi possível isolar 29 transformantes, dez foram purificados monosporicamente.

4.5. Estabilidade mitótica dos transformantes

O teste de estabilidade mitótica foi realizado com dez transformantes tomados ao acaso. Todos os transformantes foram capazes de crescer em meio seletivo contendo higromicina após cinco gerações em meio de cultivo não seletivo.

4. 6. Triagem dos transformantes: identificação do mutante $\Delta mfs1$

A confirmação da interrupção gênica foi realizada pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos CIF e CIR. De todos os transformantes analisados, apenas em um foi identificada a ocorrência de integração gene-específica, pois a amplificação feita a partir do DNA genômico do fungo selvagem revelou um fragmento de DNA com 2015 pb (que corresponde ao gene *mfs1*), enquanto a amplificação feita a partir do DNA genômico do transformante com integração específica apresentou um fragmento de DNA com 6234 pb, produto da junção das regiões flanqueadoras do gene *mfs1* com o gene que confere resistência à higromicina. Após a triagem de transformantes por PCR (Figura 8), o transformante identificado como $\Delta mfs1$ foi escolhido para a realização das análises fenotípica por apresentar a interrupção específica do gene *mfs1*.

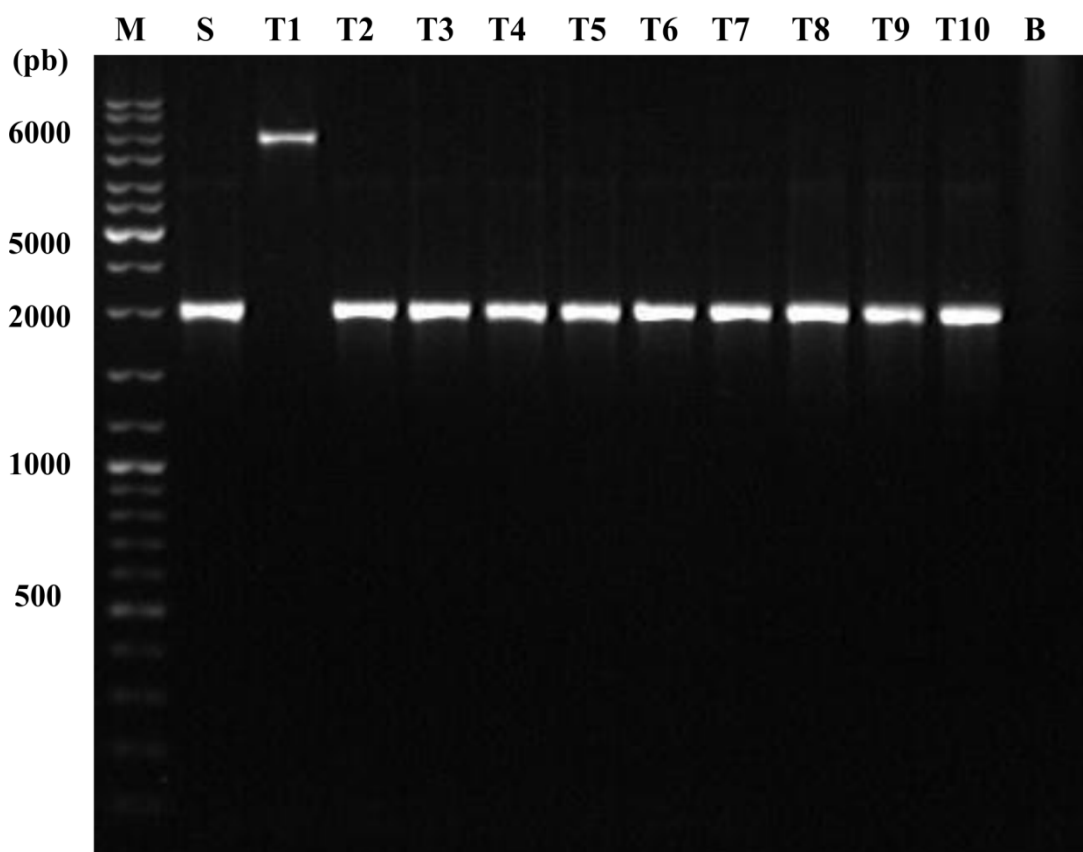


Figura 8. Confirmação do mutante para o gene *mfs1*. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. (S) Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do DNA genômico de *C. lindemuthianum* selvagem com oligonucleotídeos que anelam na região flanqueadora do gene *mfs1*; (T1 a T10) Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do DNA genômico de transformantes resistentes a higromicina. Em (T1) é possível confirmar a obtenção de $\Delta mfs1$, onde o produto de PCR apresentou o tamanho referente ao gene *mfs1* interrompido com o cassete de resistência a higromicina; (B) Controle negativo da reação de PCR, branco. (M) Marcador *GeneRuler*TM 1 Kb DNA Ladder Plus.

4. 7. Caracterização molecular dos transformantes

Uma caracterização molecular da integração dos fragmentos de DNA gerados por *Split-Marker* no genoma dos transformantes foi realizado por *Southern blotting*, utilizando-se, como sonda um fragmento de DNA de 760 pb referente à porção inicial do gene *mfs1* (Sonda 2), e também um fragmento de DNA com 712 pb do gene que confere resistência a higromicina presente no pAN7.1 (Sonda 3). Esta análise foi realizada com oito transformantes, sendo um deles o mutante $\Delta mfs1$. Na Figura 9, quando foi utilizada a sonda 2 e a enzima *SalI* a qual não cliva dentro do gene *mfs1*, mas possui um sítio de clivagem em sua região flanqueadora e também no gene que confere resistência a higromicina é possível verificar várias integrações ectópicas em sete transformantes, com exceção do mutante $\Delta mfs1$ (T1), confirmando a integração específica, e a presença de uma única cópia do gene. Nesta primeira análise foi possível observar um fragmento de DNA de 6,3 kb nos genomas dos transformantes que não apresentaram integração específica e também do selvagem. Enquanto os transformantes com integração específica apresentaram um fragmento com aproximadamente 3,7 kb, inclusive o mutante $\Delta mfs1$.

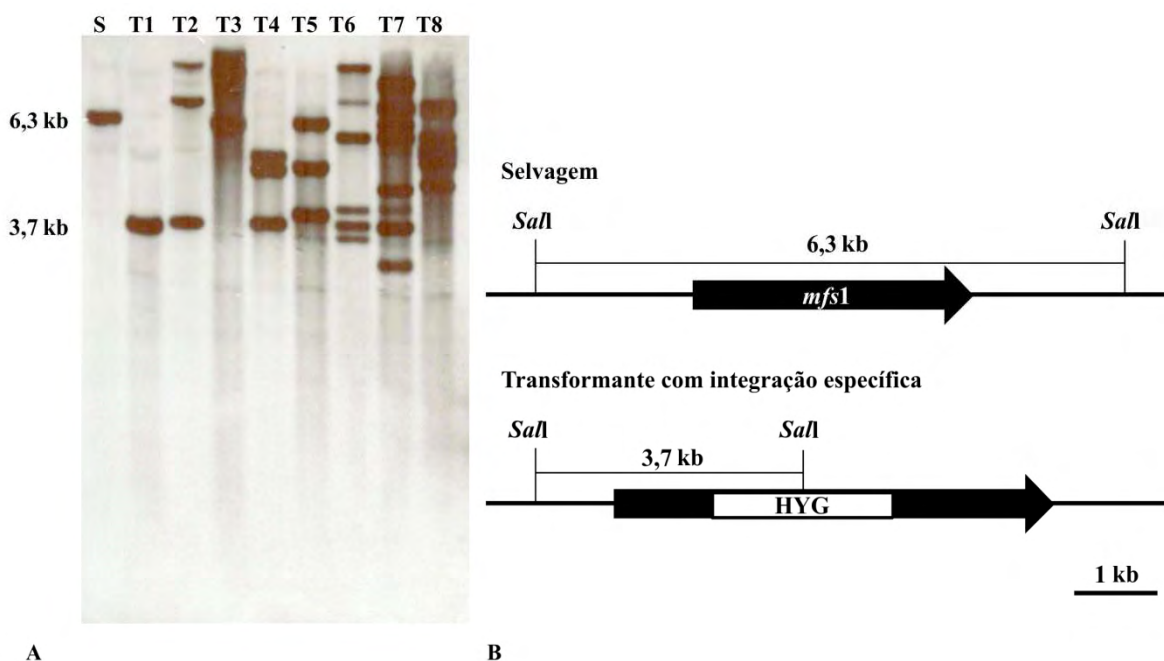


Figura 9. Caracterização molecular dos transformantes: determinação do número de cópias do gene *mfs1* e tipo de integração. (A) Auto-radiografia da hibridização do DNA total de *C.lindemuthianum* selvagem (S) e transformantes (T1 a T8) clivados com a enzima *SalI* com a sonda de 760 pb (Sonda 2). (B) Perfil de integrações específicas para o fungo selvagem e transformantes, e os tamanhos correspondentes esperados de DNA hibridizados.

Para investigar o perfil de integração do gene que confere resistência à higromicina, foi feita uma análise por *Southern blotting* utilizando-se a sonda 3 e a endonuclease de restrição *ScaI* a qual não cliva dentro do gene *mys1*, mas possui um sítio de clivagem no gene que confere resistência a higromicina, porém não dentro do fragmento de DNA específico para o gene da higromicina, utilizado. Na figura 10 é possível observar pelo menos um fragmento de DNA de aproximadamente 1 kb nos genomas dos transformantes, e ausência do mesmo no genoma do selvagem. A partir desta análise confirmamos que o mutante $\Delta mys1$ (transformante T1), apresenta apenas uma cópia do gene que confere resistência à higromicina, enquanto os demais transformantes apresentaram além do fragmento de DNA de 1 kb, outros fragmentos de DNA de tamanhos diferentes hibridizando com a sonda, demonstrando as integrações ectópicas ao longo do genoma do fungo.

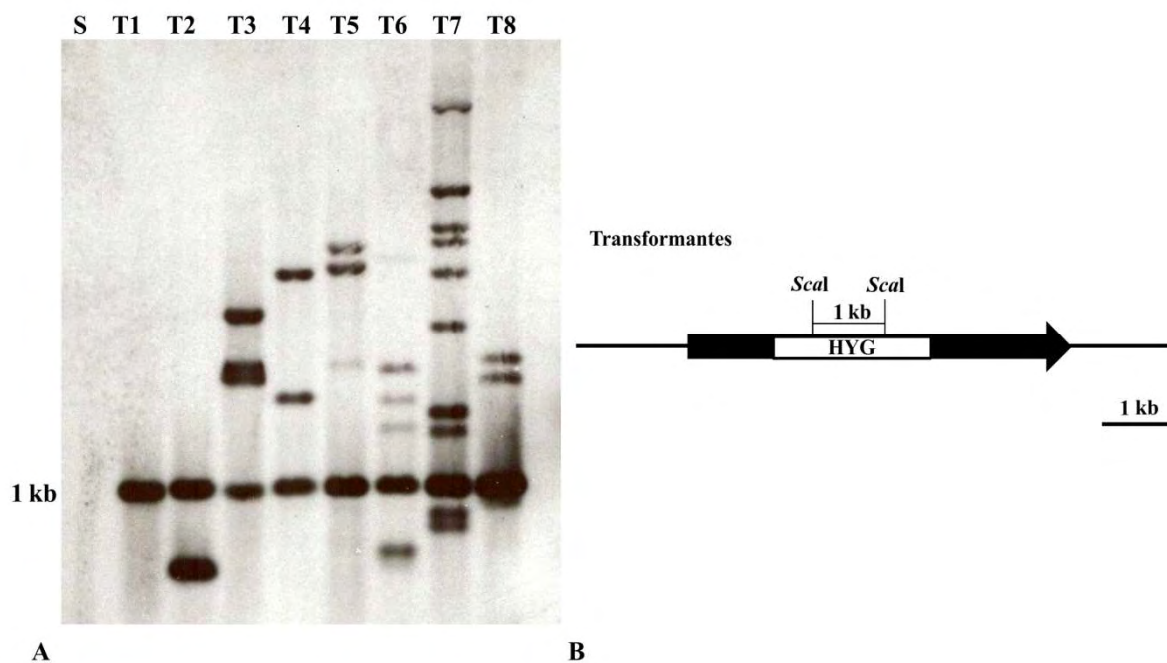


Figura 10. Caracterização molecular dos transformantes: determinação do número de cópias do gene *hyg* e tipo de integração. (A) Auto-radiografia da hibridização do DNA total de *C.lindemuthianum* selvagem (S) e transformantes (T1 a T8) clivados com a enzima *ScaI* e hibridizado com a sonda de 712 pb (Sonda 3). (B) Esquema do gene *mys1* (seta preta) dos transformantes interrompido com o gene que confere resistência a higromicina, mostrando os sítios de restrição para *ScaI*.

Os resultados obtidos a partir das análises das figuras 9 e 10 confirmam que o transformante T1, denominado $\Delta mys1$, é específico para o gene *mys1*, apresentando a integração específica e nenhuma outra cópia adicional dos genes *mys1* e *hyg*, podendo ser utilizado para as análises de inferência funcional do gene.

4. 8. Análise fenotípica do mutante $\Delta mfs1$: análise funcional do gene *mfs1*

4. 8. 1. Teste de patogenicidade

Para investigar a possível relação do gene *mfs1* com a patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum* raça 89 em feijoeiro susceptível, o mutante $\Delta mfs1$ foi utilizado no teste de patogenicidade em folhas destacadas de feijoeiro Rosinha.

Assim como no fungo selvagem, no mutante a ocorrência de sintomas na folha iniciou a partir do quinto dia de inoculação, o que é condizente com o início da fase necrotrófica (Figura 11).

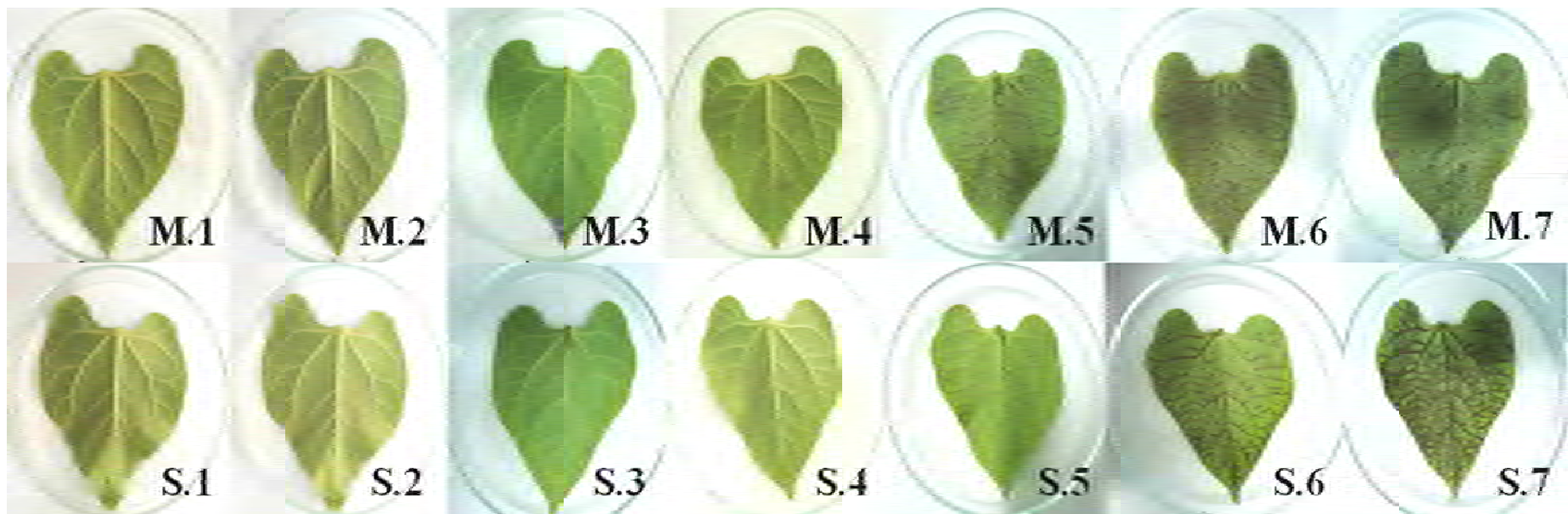


Figura 11. Análise da patogenicidade de *C. lindemuthianum* $\Delta mfs1$. As letras e os números representam as linhagens selvagem e mutante $\Delta mfs1$ de *C. lindemuthianum* e os dias após a inoculação em folhas destacadas de feijoeiro susceptível, Rosinha, respectivamente.

4.8.2. Avaliação da sensibilidade a diferentes fungicidas

Os dados referentes ao índice de crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante, $\Delta mfs1$, em diferentes concentrações de mancozeb, tebuconazole e óxido cuproso encontram-se na Tabela 6. Para o índice de crescimento micelial, o fungicida mais eficiente foi o tebuconazole, apresentando uma concentração mínima inibitória (CMI) entre 1 a 10 PPM, enquanto para o fungicida mancozeb e o óxido cuproso não foram encontrados resultados satisfatórios nos testes *in vitro*, uma vez que a inibição total só ocorreria em tratamentos com concentrações acima de 1000 ppm, principalmente para o óxido cuproso. Os resultados foram semelhantes para as linhagens selvagem e mutante.

Tabela 6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e $\Delta mfs1$, e a concentração mínima inibitória (CMI) de cada fungicida testado.

Concentrações (ppm)	Fungicidas/% de inibição					
	Mancozeb		Tebuconazole		Óxido cuproso	
	Selvagem	$\Delta mfs1$	Selvagem	$\Delta mfs1$	Selvagem	$\Delta mfs1$
1	21,3 ²	19,51	40,3	40,73	7,1	7,32
10	25,8	22,68	100,0	100,0	4,7	4,8
100	33,7	34,15	100,0	100,0	4,9	4,8
500	56,5	55,22	100,0	100,0	14,0	14,6
1000	79,6	79,5	100,0	100,0	29,5	30,0
CMI¹	>1000	>1000	1 - 10	1 - 10	>1000	>1000

¹ Intervalo entre concentrações, onde podem-se encontrar valores de 100% de inibição do crescimento micelial;

² Inibição do crescimento micelial dado em % (Média de três repetições).

Uma tendência geral foi observada, uma vez que os três fungicidas apresentaram maior eficiência na inibição do crescimento micelial em maiores concentrações. A eficiência das concentrações entre os três tipos de fungicidas variou significativamente, sendo o fungicida tebuconazole mais eficiente em todas as concentrações quando comparado aos demais fungicidas.

Em relação à eficiência dos três fungicidas utilizados, foi possível observar que as diferenças foram significativas, sendo o fungicida tebuconazole o mais eficiente, e o óxido

cuproso o menos eficiente. Os tratamentos com o fungicida tebuconazole apresentaram uma menor média de crescimento micelial, representando um maior potencial de inibição do crescimento deste fungo, enquanto os tratamentos com óxido cuproso apresentaram maiores médias de crescimento micelial e um menor potencial de inibição. A diferença no crescimento micelial em tais tratamentos foi superior a 50 %, como pode ser observado na Figura 12.

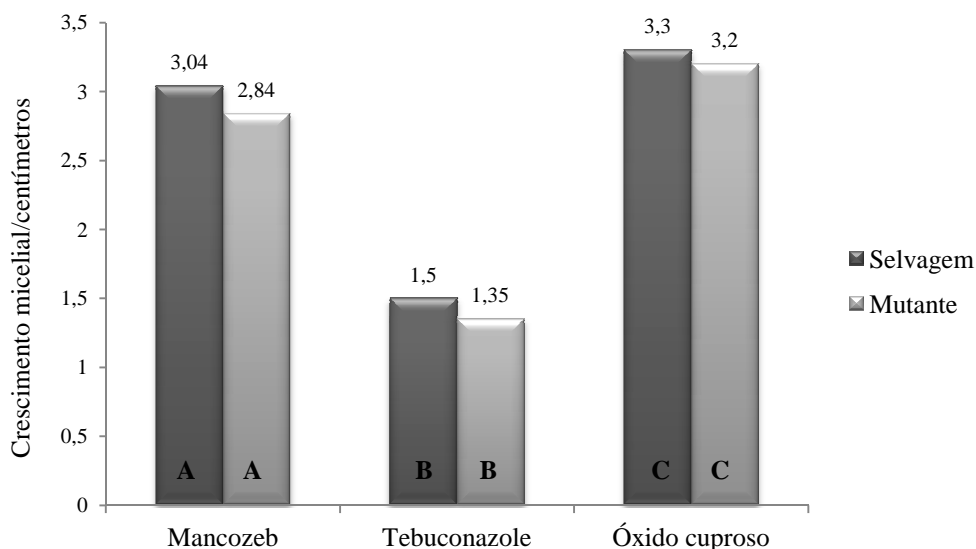


Figura 12. Eficiência dos fungicidas mancozeb, tebuconazole, e óxido cuproso na inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante. No eixo Y é possível observar o crescimento micelial dos fungos em centímetros, enquanto no eixo X estão distinguidos os três fungicidas utilizados. As colunas que receberam a mesma letra não diferem significativamente ao nível de 0,05 % de significância pelo Teste de Tukey.

A partir destas análises foi possível verificar que possivelmente o gene *mfs1* não é um transportador de membrana envolvido com efluxo de drogas ou com fenótipo de sensibilidade ou resistência a drogas, pelo menos nas testadas, uma vez que o comportamento das duas linhagens, selvagem e mutante, foram semelhantes.

4.8.3. Avaliação do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em diferentes fontes de açúcares

Análises preliminares realizadas por Santos (2010) sugeriam que a possível função do gene *mfs1* era transportar açúcares em *C. lindemuthianum*. Mediante esta observação, as linhagens selvagem e mutante foram analisadas em relação ao uso de diferentes açúcares, como únicas fontes de carbono no meio de cultivo.

Neste sentido, o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* apresentou diferenças significativas, quando foi avaliada a interação dos diferentes tratamentos (o tipo de açúcar), e os fungos selvagem e mutante $\Delta mfs1$.

O fungo selvagem e o mutante apresentaram crescimento significativamente diferenciado quando cultivados em meio mineral contendo glicose, frutose e manose, como únicas fontes de carbono (Figura 13). A maior variação nas médias de crescimento ocorreu nos meios contendo glicose e manose, onde o fungo selvagem apresentou o diâmetro da colônia 50 % maior quando comparado ao mutante $\Delta mfs1$ (Figura 14).

A partir destes resultados podemos confirmar que o gene *mfs1* codifica uma proteína transportadora de membrana com pelo menos a função de transporte de glicose, manose e frutose, portanto de monossacarídeos, essenciais ao metabolismo primário do fungo, uma vez que o crescimento micelial do mutante $\Delta mfs1$ foi drasticamente alterado quando este foi cultivado em meio mineral contendo apenas glicose, manose ou frutose, como fontes de carbono.

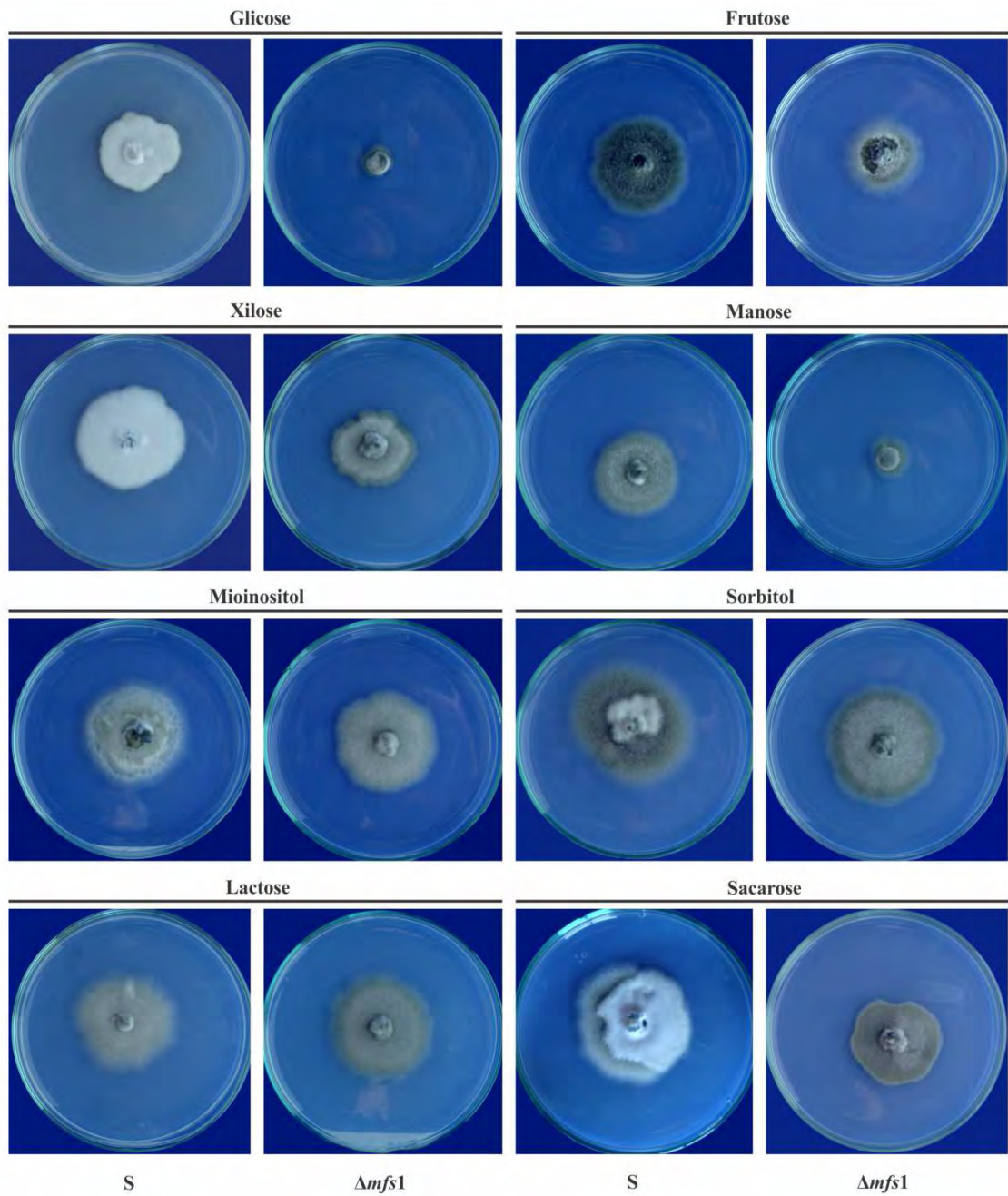


Figura 13. Crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante $\Delta mfs1$ em diferentes fontes de açúcares. Após dez dias de cultivo o fungo selvagem (S) apresentou crescimento diferenciado do mutante $\Delta mfs1$ quando crescido em meio mínimo contendo glicose, manose e frutose.

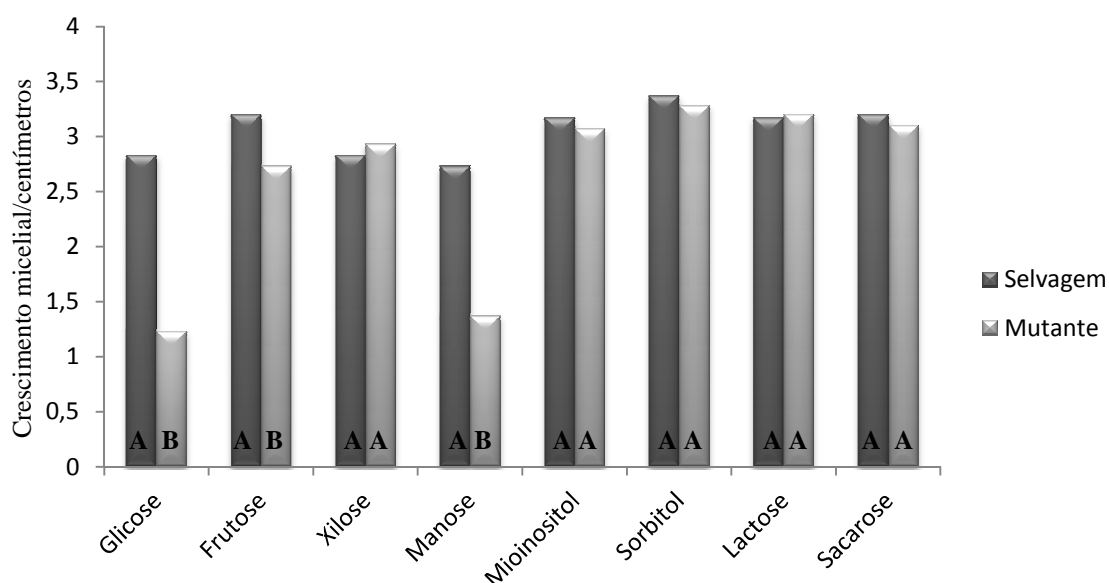


Figura 14. Crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante $\Delta mfs1$ em diferentes fontes de açúcares. No eixo Y é possível observar o crescimento micelial dos fungos, enquanto no eixo X estão distinguidos os tratamentos com as diferentes fontes de carbono no fungo selvagem e mutante. As colunas que receberam a mesma letra não diferem significativamente a 0,05 % de significância pelo Teste de Tukey.

4.8.4. Avaliação da produção e da germinação de conídios

Para investigar a relação entre o produto do gene *mfs1* e funções essenciais na manutenção da viabilidade fúngica, foi determinada a eficiência na produção e na germinação de conídios nos fungos *C. lindemuthianum* selvagem e o mutante $\Delta mfs1$. Com este propósito, após nove dias da inoculação do micélio de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante, em vagem estéril, não se observou sinais de conidiação em 10 inóculos avaliados, enquanto o mutante $\Delta mfs1$ já apresentava uma densa massa alaranjada de conídios em todos os inóculos avaliados (Figura 15). Embora a massa micelial fosse menor do que do fungo selvagem. A conidiação do fungo selvagem iniciou 15 dias após a inoculação (dados não mostrados).

Neste contexto, após 96 horas de incubação a 22 °C os conídios de *C. lindemuthianum* selvagem apresentaram uma taxa de germinação de aproximadamente 100 % nos três diferentes meios de cultivo GPYECH (controle), MM suplementado com manose e MM suplementado com glicose (5%), enquanto o mutante $\Delta mfs1$ ainda não apresentavam seus conídios germinados nos três diferentes meios de cultivo (Figura 16) A germinação foi investigada apenas em meio contendo glicose ou manose, uma vez que estes foram os açúcares que apresentaram os maiores efeitos no crescimento do fungo mutante. No período

de observação a linhagem selvagem apresentava todo o seu crescimento na forma de hifas, com o micélio vegetativo formado.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos podemos confirmar que o produto do gene *mfs1* está envolvido com a viabilidade celular de *C. lindemuthianum*, uma vez que a produção de conídios no mutante se torna mais precoce em relação ao selvagem, quando cultivado em vagem, no entanto o desenvolvimento do micélio vegetativo é mais lento, em relação à germinação, esta é afetada bruscamente se o fungo mutante é cultivado em meio contendo apenas glicose ou manose como fontes de carbono, e também no meio GPYECH.

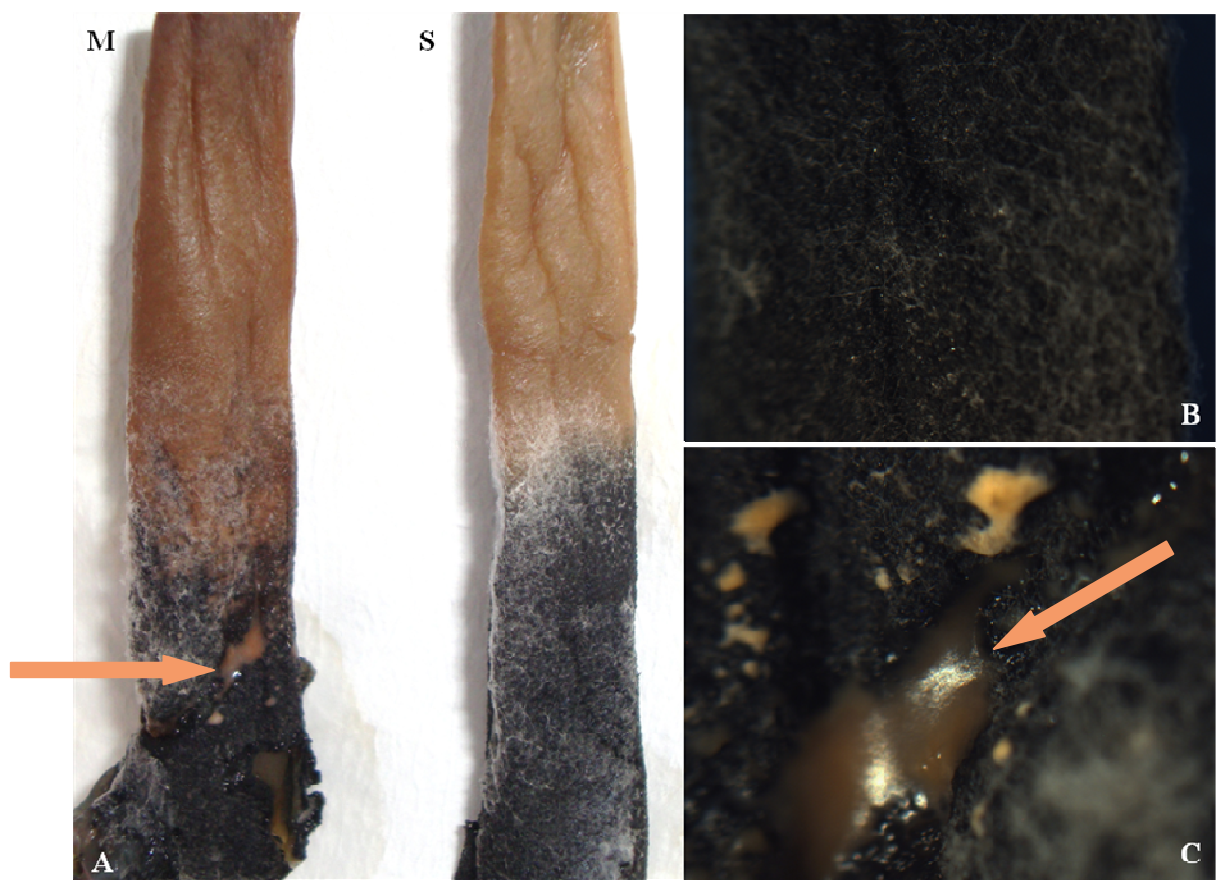
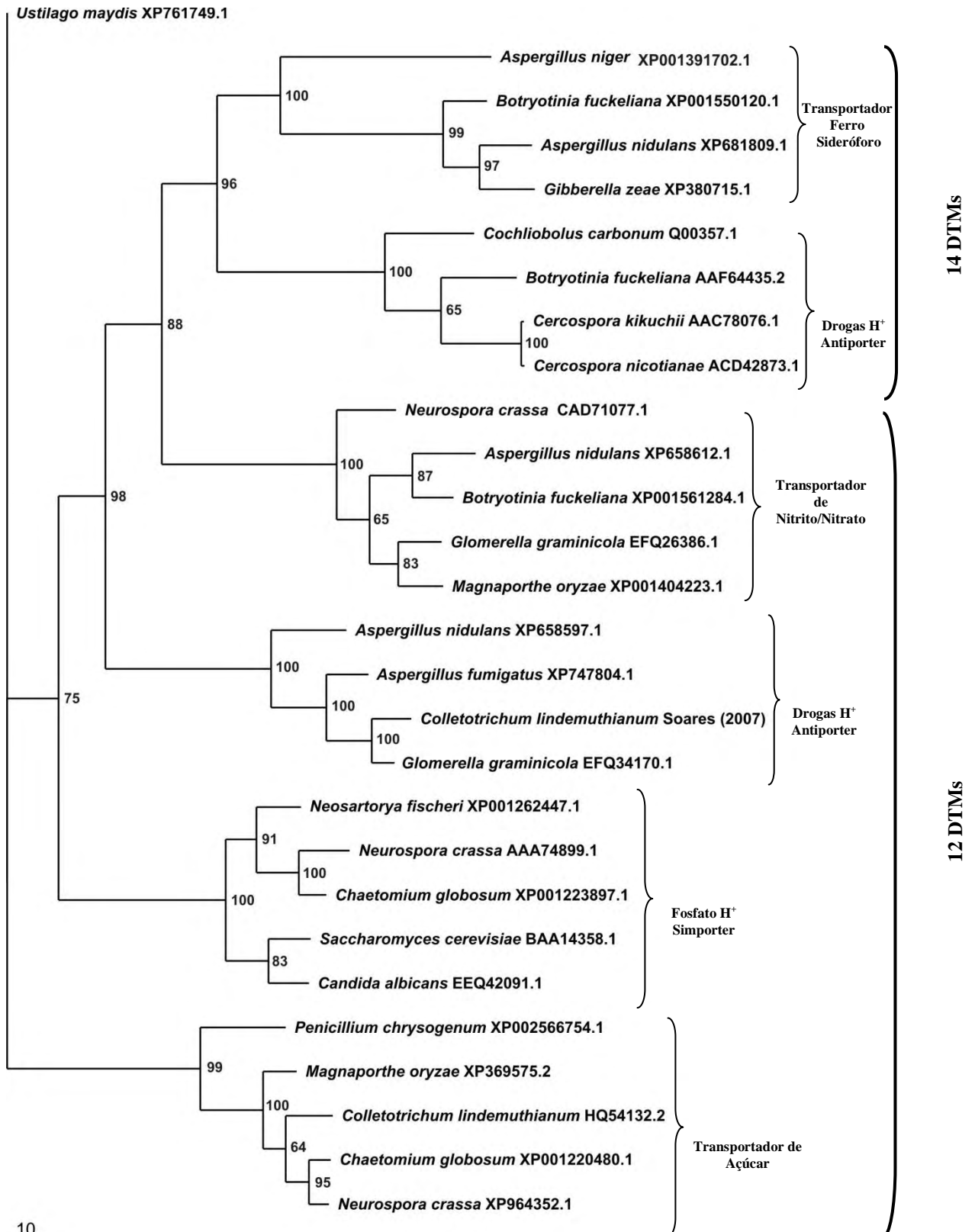


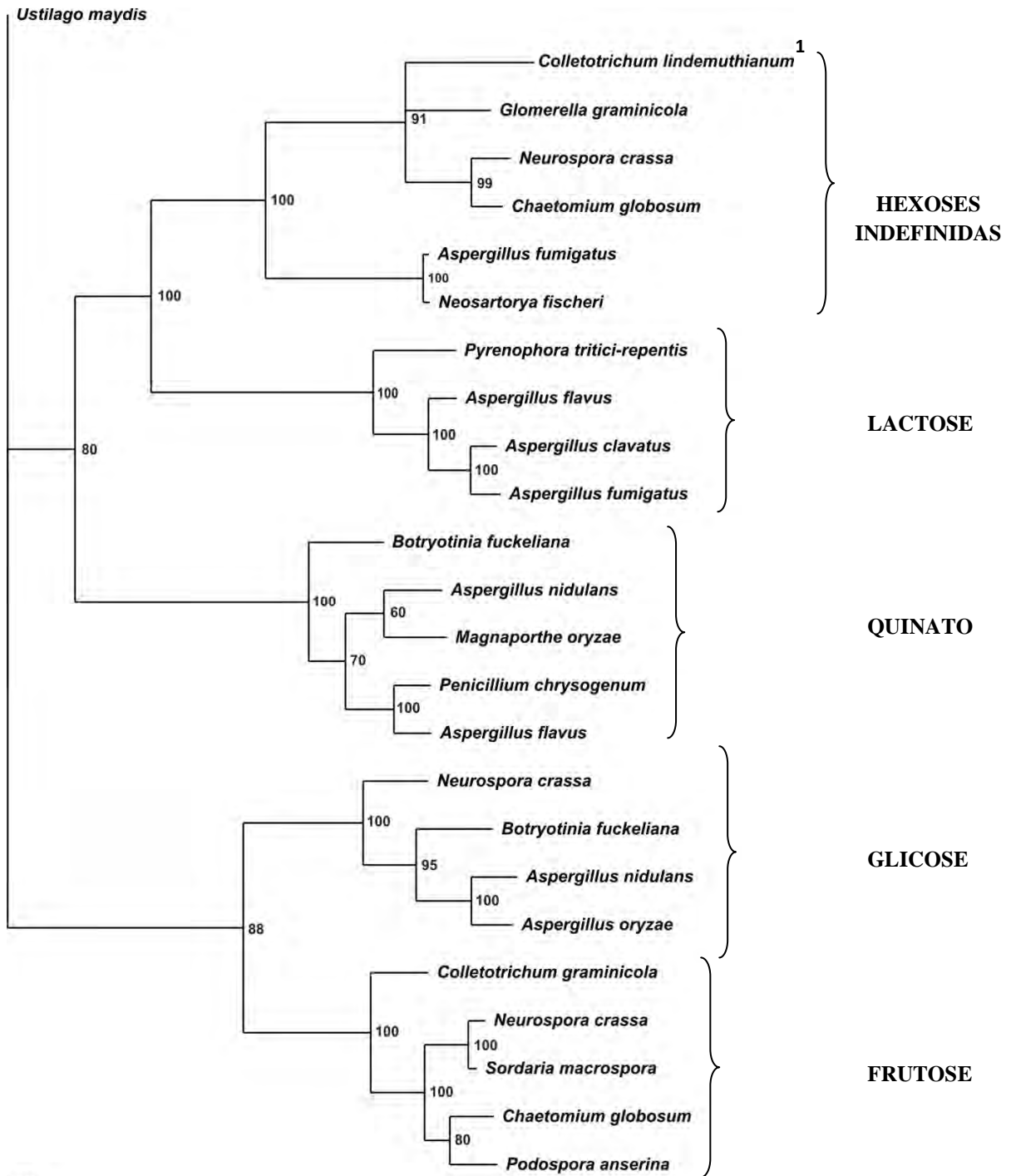
Figura 15. Conidiação de *C. lindemuthianum* selvagem e do mutante $\Delta mfs1$. (A) Mutante $\Delta mfs1$ (M) esporulando na superfície de uma vagem de feijoeiro comum após 10 dias de inoculação, enquanto o fungo selvagem (S) não apresenta sinais de esporulação. (B) Superfície da vagem inoculada com o fungo selvagem, com o aumento de 27 X, mostrando a presença de hifas sobre o tecido vegetal necrosado e ausência de massa de conídios. (C) Superfície da vagem inoculada com o mutante $\Delta mfs1$, com o aumento de 27X, mostrando a presença de hifas sobre o tecido vegetal necrosado e a presença de uma densa camada de conídios. As setas indicam a massa mucilaginosa repleta de conídios.

A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento de sequências de aminoácidos de proteínas pertencentes à superfamília MFS. Na Figura 19, é possível observar transportadores de seis famílias distintas, o gene *mfs1* foi agrupado com membros da família de transportadores de açúcares (*Sugar Porter SP*), incluindo transportadores de monossacarídeos descritos em *N. crassa*. Na análise também foi possível observar a ocorrência de dois grupos distintos: um contendo membros da família de transportadores DHA14 e IST, ambos apresentando 14 DTMs, e o segundo grupo incluindo todas as famílias com 12 DTMs, onde a proteína Mfs1 se encontra. A partir da informação de que a proteína Mfs1 se agrupou na família de transportadores de açúcares, uma nova análise foi realizada somente com proteína MFS envolvidas com o transporte de açúcares. Na árvore obtida é possível observar que os transportadores da família *SP* se agrupam de acordo com o tipo de açúcar transportado, a proteína *mfs1* encontra-se agrupada com transportadores de monossacarídeos, como já evidenciado em nossas análises, o que corrobora com nossos resultados, no entanto, não no mesmo ramo das proteínas transportadoras de glicose cujo as sequências estão depositadas nos bancos de dados.



_ 10

Figura 17. Árvore filogenética de membros da superfamília MFS pertencentes ao Filo Ascomycota, incluindo a proteína Mfs1 de *C. lindemuthianum* (HQ54132.2). O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre as espécies. A árvore enraizada com o fungo Basidiomycota *U. maydis* foi obtida pelo método de Máxima Parcimônia através do programa PAUP * 4.0b10. Os números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as ramificações foram observadas, com base em 1.000 replicatas.



10

Figura 18. Árvore filogenética de membros da família SP pertencentes ao Filo Ascomycota, incluindo a proteína Mfs1 de *C. lindemuthianum* ⁽¹⁾. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre as espécies. A árvore enraizada com o fungo Basidiomycota *U. maydis* foi obtida pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa PAUP* 4.0b10. Os números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* nas quais as ramificações foram observadas, com base em 1.000 replicatas.

5. DISCUSSÃO

O gene *mfs1* está presente em cópia única no genoma de *C. lindemuthianum* e situado *downstream* à sua ORF foi encontrado um gene que codifica uma proteína possivelmente envolvida com a regulação da expressão de genes, incluindo o próprio *mfs1*. O gene identificado codifica uma proteína regulatória transcricional, contendo o domínio Zn₂-Cys₆ de ligação ao DNA. As proteínas dedo de zinco estão divididas em três classes, sendo a classe III (C₆) estritamente para fungos. Essas proteínas desempenham papéis importantes nos processos de transcrição e tradução, podendo ainda atuar como mediadores em interações proteína-proteína e estar relacionadas com complexos remodeladores de cromatina (MACPHERSON et al., 2006).

Para investigar uma possível relação entre este gene, identificado como *ft1*, e o gene *mfs1* foi feita uma análise do promotor de *mfs1*, onde foram encontrados *cis* elementos envolvidos com o controle da regulação da expressão gênica por repressão catabólica e pelo pH do ambiente (DOWZER & KELLY, 1991; TILBURN et al., 1995). Além do domínio típico encontrado na proteína putativa Ft1 foi também identificada uma sequência de endereçamento nuclear da proteína R R H V T R R G K S D L I L E G como identificada em outros genes cujos produtos atuam no núcleo (KALDERON et al., 1984). Outros trabalhos relatam o envolvimento de proteínas reguladoras transcricionais contendo o domínio de ligação ao DNA Zn(2)-Cys(6) na regulação da expressão de genes que codificam transportadores de membrana, tanto da família ABC quanto MFS, especificamente envolvidos com o fenótipo de múltipla resistência a drogas (MDR), principalmente em leveduras, como em *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (COSTE et al., 2008; KUO et al., 2010).

O ativador transcricional Gal4p é a proteína pertencente à classe III (C₆) até então melhor caracterizada, estando envolvida na ativação de genes relacionados com o metabolismo da galactose em *S. cerevisiae* (MARMOSTEIN et al., 1992; BREUNIG, 2000). No entanto, este não é o único ativador pertencente à classe III relacionado com o metabolismo de açúcares. Já foi constatado o envolvimento desta proteína na ativação e repressão de genes que codificam proteínas MFS responsáveis pelo transporte de hexoses (OZCAN et al., 1999; SOONTORNGUN et al., 2007). Em *Neurospora crassa*, um transportador de glicose, denominado Rco3, funciona como um sensor de nutrientes, ativando o transporte de glicose e a conidiação do fungo, estando envolvido com cascatas de transdução de sinais que culminam com a expressão de genes, incluindo ativadores

transcricionais de outros genes transportadores (MADI et al., 1997). Outros ativadores transcricionais contendo o domínio Zn₂-Cys₆ de ligação ao DNA também foram relacionados com a ativação de genes envolvidos no metabolismo de maltose (NEEDLEMAN, 1991).

O gene *mfs1* encontra-se presente em cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*, de modo semelhante ao que ocorre com outros genes codificadores de proteínas MFS em fungos filamentosos (VAN DEN BERG et al., 2008; LEVÉSQUE et al., 2010). Devido a proximidade com o gene *Ft1* e relação esta já identificada em outros fungos na literatura, é possível que o gene *mfs1* esteja inserido em um conjunto de genes com funções relacionadas. Esta organização já foi constatada com transportadores MFS de outros fungos filamentosos entre eles *Fusarium sporotrichioides*, onde seus genes envolvidos na biossíntese de tricotecenos estão localizados dentro de um *cluster* de genes. Dentro deste *cluster* está o gene *Tri12* que codifica um transportador MFS com 14 DTMs. A 405pb *upstream* de *Tri12* encontra-se o gene *Tri16* que codifica uma proteína reguladora transcricional requerida para a expressão de *Tri12*. Duas cópias do gene *Tri16* também foram encontradas na região flangeadora 3' de *Tri12* (ALEXANDER et al., 1999; PELOW et al., 2003).

A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*, embora tenha apresentado uma baixa eficiência de transformação e também um alto número de integrações ectópicas.

Foi observado que 75 % dos transformantes apresentavam integração específica, este fato pode ser atribuído a interrupção ter ocorrido via recombinação homóloga. Mesmo os transformantes com integração específica apresentaram integrações ectópicas ou em *tandem*, porém, foi possível fazer o estudo da função do gene *mfs1* em um mutante com ausência de integrações inespecíficas.

As integrações ectópicas consistem em um grande problema, quando o objetivo é interromper um único gene, pois estas podem interferir no fenótipo do mutante. Embora a aplicação da técnica de *Split-Marker* não tenha sido suficiente para prevenir integrações ectópicas em *C. lindemuthianum*, ela vem sendo aplicada com sucesso em outros fungos filamentosos. A eficiência desta técnica na prevenção de integrações ectópicas foi reportada por Colot et al.(2006), em trabalhos realizados com o fungo *N. crassa*, com o objetivo de interromper um grupo de genes que codificam fatores de transcrição e posteriormente analisar seus fenótipos. Neste trabalho foi obtido 44 % de transformantes por substituição, dos quais 68 % estavam livres de integrações ectópicas, constituindo-se assim em uma forte aliada no estudo da função de genes em fungos filamentosos.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram encontrados com o fungo fitopatogênico *Cercospora nicotianae*, na tentativa de interromper oito genes que formam um *cluster* relacionado à via biossintética da toxina cercosporina. Na caracterização molecular destes transformantes foi observado que o tamanho da sequência homóloga de DNA presente nos fragmentos de PCR está diretamente relacionado com a eficiência da técnica em obter integrações específicas. Melhores resultados foram obtidos quando os fragmentos continham no mínimo 0,8 kb em ambas as extremidades. A aplicação da técnica de *Split-Marker* em *C. nicotianae* revelou um alto número de integrações ectópicas (inespecíficas ou em *tandem*), em adição às integrações específicas. Apesar das integrações ectópicas, a frequência de integrações homólogas foi alta, mostrando a eficiência da técnica de interrupção gênica quando comparada a outras técnicas moleculares aplicadas ao genoma de *C. nicotianae* (BANG-JAU et al., 2009).

Observações macroscópicas da colônia do mutante $\Delta mfs1$ não evidenciaram diferenças morfológicas entre este e a linhagem selvagem de *C. lindemuthianum*. Porém, a conidiação do mutante $\Delta mfs1$ mostrou-se mais precoce. Resultados semelhantes foram encontrados em mutantes para o gene *Rco3*, que codifica um transportador de glicose no fungo filamentosso *N. crassa*. Neste mutante a indução do processo de esporulação foi associada ao decréscimo na captação de glicose, sugerindo então que a proteína RCO3 funciona como um transportador e sensor de altas e baixas concentrações de glicose. Sendo assim, o mutante com o gene inativo não foi capaz de reprimir o transporte de glicose quando este fungo se encontrava em meio com baixas ou altas concentrações deste açúcar, o que ocasionou a conidiação precoce deste fungo (MADI et al., 1997).

A concentração de carboidratos solúveis no tecido vegetal, em geral decresce durante a colonização, ao iniciar-se a esporulação, sendo assim a inativação de um sensor de baixas concentrações de açúcar pode acelerar o processo de conidiação, que muitas vezes está relacionado a situações de estresse (PAN et al., 1990). Estas informações estão condizentes com os dados sobre a expressão do gene *mfs1* obtidos por Santos (2010), sendo detectado somente nos últimos dias de infecção em folhas de feijoeiro, fase esta necrotrófica, onde certamente já ocorre uma escassez de açúcares (baixas concentrações).

Em fungos filamentosos, a genética da percepção e transporte de açúcares ainda é pouco estudada. No fungo micorrízico *Amanita muscaria* foi descrita a caracterização de um transportador de monossacarídeos AmMst1, visando uma melhor compreensão em nível molecular, do suprimento de carboidratos derivados da planta para o fungo. A análise da

expressão gênica de *AmMst1* em diferentes concentrações de glicose, indica que o gene é expresso de forma constitutiva em baixos níveis de glicose, sendo induzido por concentrações acima de 5 mmol L⁻¹ (NEHLS et al., 1998).

A relação entre desenvolvimento fúngico e captação de açúcares também foi observada no fungo fitopatogênico *Uromyces fabae*, um parasita biotrófico obrigatório. Neste fungo o transportador de glicose HXT1 foi identificado quando se procurava por genes preferencialmente expressos em haustórios. Análises de *Northern blot* e imunofluorescência indicam que o gene é expresso exclusivamente nos haustórios, o que forneceu uma evidência concreta que estas estruturas estão envolvidas com a captação de açúcares neste fitopatógeno, mesmo não se tratando de um gene exclusivamente envolvido com a virulência (VOEGELE et al., 2001), assim como o gene *mfs1*, visto que o fungo mutante $\Delta mfs1$ não mostrou redução nos sintomas, no entanto aparentemente acelerou o aparecimento destes, indicando este ser um gene importante na manutenção de fontes de carbono pelo fungo.

Os perfis de crescimento micelial de *C. lindemuthianum* selvagem e mutante apresentaram diferenças significativas quando os fungos foram cultivados em meio contendo glicose, frutose e manose. Muitos transportadores de membrana foram identificados em *Saccharomyces cerevisiae*, cerca de 271 (VAN BELLE & ANDRÉ, 2001), destes pelo menos 20 estão envolvidos com o transporte de hexoses (WIECZORK et al., 1999). Em *A. nidulans*, aproximadamente 17 proteínas já foram identificadas como sendo transportadores de hexoses (WEI et al., 2004). Os conídios do mutante $\Delta mfs1$ apresentaram a germinação mais lenta quando comparada com o fungo selvagem. Esta característica provavelmente é decorrente da inativação do gene *mfs1*. Na literatura já foi documentado em *A. nidulans* e *B. cinerea* a ligação entre transportadores de hexose sensíveis a baixas concentração de glicose e germinação de conídios (DOEHLEMANN et al., 2005; FORMENT et al., 2006). Na última década houve um crescente interesse no estudo de proteínas transportadoras de membrana MFS em fungos patogênicos, especificamente *Candida albicans*, devido ao envolvimento destas proteínas com fenótipos de múltipla resistência a drogas (GAUR et al., 2008). Nos testes de sensibilidade realizados com os fungicidas mancozeb, tebuconazole e óxido cuproso, o gene *mfs1* não apresentou alguma relação com fenótipo de resistência a drogas, visto que o fungo *C. lindemuthianum* selvagem e mutante não mostraram diferenças significativas no perfil de sensibilidade entre os fungicidas aplicados em cada tratamento e também as diferentes dosagens analisadas, no entanto, ambos apresentaram uma maior sensibilidade ao tebuconazole, um fungicida sistêmico pertencente ao grupo dos triazóis, cujo

modo de ação está relacionado com a inibição da síntese de esteróis (REIS et al., 2001). A eficiência de fungicidas do grupo químico dos triazóis na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* já foi comprovada em outros trabalhos (FREEMAN et al., 1997).

A inativação de genes que codificam proteínas transportadoras MFS muitas vezes está relacionada com alterações no processo MDR, e perda de resistência a drogas, como já foi verificado no fungo *B. cinerea*, onde a inativação de um gene que codifica uma proteína MFS resultou na perda de tolerância a compostos tóxicos naturais presentes no ambiente, e também a outros fungicidas (HAYASHI et al., 2002).

O fenômeno MDR também foi comprovado em *C. albicans*, onde após uma mutação sítio direcionada ao gene *Mdr1p*, os mutantes passaram a apresentar um aumento na susceptibilidade a drogas (KAPOOR et al., 2010). O mutante $\Delta mfs1$ não apresentou variações na sensibilidade à fungicida quando comparado ao fungo selvagem. Evidenciando que o gene *mfs1*, não está relacionado com o processo MDR em *C. lindemuthianum*.

Todos os dados obtidos nos sugerem que o gene *mfs1* codifica uma proteína transportadora de membrana, com 12 DTMS, envolvida com o transporte de monossacarídeos, especificamente hexoses, podendo transportar preferencialmente glicose, seguida de manose e frutose em um meio onde haja baixas concentrações destes açúcares. A ocorrência de transportadores MFS com habilidade de transportar vários substratos semelhantes já é bem documentada (PAULSEN et al., 1996; FORMENT et al., 2005).

Após a análise da sequência deduzida de aminoácidos da proteína MFS1, que revela a presença de 12 DTMs, uma organização típica para muitas famílias de proteínas MFS inclusive da família SP, e também da similaridade desta com outras proteínas pertencentes à família SP descritas anteriormente, à análise filogenética desta proteína vem corroborar a hipótese que o gene *mfs1* codifica uma proteína transportadora de açúcares.

A idéia de que famílias de transportadores MFS se relacionam filogeneticamente de acordo com a sua função (PAULSEN et al., 1996; PAO et al., 1998) sugere que cada família deve reconhecer e transportar uma classe distinta de compostos estruturalmente relacionados, devido a presença de motivos conservados específicos para cada família de transportadores MFS (DEL SORBO et al., 2000; LAW et al., 2008).

A análise filogenética indicou que a proteína *Mfs1* está relacionada com transportadores MFS da família SP. Esta relação é confirmada pelo agrupamento dos integrantes em um ramo monofilético sustentado por um valor de *bootstrap* igual a 99.

A análise realizada com os transportadores das famílias de IST, DHA14, NNP, DHA12, PHS e SP revela um agrupamento de transportadores de 14 DTMs sustentado por um valor de *bootstrap* igual a 96. A análise ainda sustenta a hipótese que estes transportadores provavelmente se originaram de um único ancestral, e que as proteínas com 14 DTMs surgiram após a aquisição adicional de 2 DMTs no domínio C-terminal da proteína (PAO et al., 1998, YIN et al., 2006).

A análise feita somente com transportadores da família SP foi realizada utilizando sequências de transportadores de açúcares distintos, e nesta análise foi observado que o transportador MFS encontra-se particularmente relacionado com transportadores de hexoses não reveladas, esta relação é confirmada pelo agrupamento dos transportadores em um ramo sustentado por um valor de *bootstrap* igual a 91.

6. CONCLUSÃO

O gene *mfs1* encontra-se organizado em cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*. A presença de *cis* elementos específicos para genes de repressão na região promotora do gene *mfs1* e a proximidade com o gene *ft1*, sugere que o gene *mfs1* esteja inserido em um conjunto de genes com funções relacionadas e que provavelmente possa ter sua transcrição regulada pela proteína *ft1*.

O presente trabalho permitiu a caracterização do gene *ft1* que codifica uma proteína regulatória transcricional, contendo o domínio Zn₂-Cys₆, na região flanqueadora 3' do gene *mfs1*.

A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *mfs1* de *C. lindemuthianum*.

O mutante $\Delta mfs1$ apresenta o gene *mfs1* inativo, estando livre de integrações ectópicas. Este mutante apresentou um processo de conidiação precoce quando comparado com o fungo selvagem, além de apresentar a germinação dos seus conídios prejudicada.

O mutante $\Delta mfs1$ não mostrou diferença na resistência as drogas testadas, sugerindo que este gene não tenha ligação com o processo MDR.

A análise filogenética com proteínas MFS de fungos pertencentes ao Filo Ascomycota, nos permite concluir que este transportador é um membro da família SP, e que as proteínas MFS estão fortemente relacionadas com o tipo de substância que é transportada.

Este trabalho nos permitiu inferir a provável função e importância do gene *mfs1* para o fungo *C. lindemuthianum*:

- Transporte de hexoses, especificamente glicose, manose e/ou frutose, podendo transportar todas, embora a glicose aparentemente apresente uma maior afinidade.
- Exerce um papel primordial na manutenção da viabilidade celular de *C. lindemuthianum*, fato este confirmado pela germinação dos conídios alterada. A sua ausência no fungo também promove um aparecimento precoce dos sintomas da antracnose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, N.J.; McCormick, S.P.; Hohn, T.M. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics* 261(1999) 977-984.

Alzate-Marin, A.L; Sartorato, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 7 (2004) 241-242.

Ansari, K.I.; Palacios, N.; Araya, C.; Langin, T.; Egan, D.; Doohan, F.M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology* 53 (2004) 635–642.

Augustin, E.; Costa, J. G. C. da. Fontes de resistência a duas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. no melhoramento do feijoeiro no Sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 6 (1971) 265-272.

Bailey, J.A.; Jeger, M.J. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford (1992) 388p.

Bang-Jau, Y.; Lee, M. H.; Chung, K. R. Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. *Archives of Microbiology* 191 (2009) 615-622.

Breunig, K. D.; Fukuhara, M. B.; Bianchi, M. M.; Bourgarel, D.; Falcone, C.; Ferrero, I.; Frontali, L.; Goffrini, P.; Krijger, J.J.Mazzoni, C.; Milkowski, C.; Steensma, H. Y.; Wesolowski-Louvel, M.; Zeeman, A. M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 771-780.

Callahan, T.M.; Rose, M.S.; Meade, M.J.; Ehrenshaft, M.; Upchurch, R.G. CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (1999) 901-910.

Catlett, N.L.; Lee, B. N.; Yoder, O.C.; Turgeon, B.G. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics News* 50 (2003) 9-11.

Chang, P.K; Yu, J; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E. The carboxy-terminal portion of the aflatoxin pathway regulatory protein AFLR of *Aspergillus parasiticus* activates GAL1::lacZ gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 2508-2512.

Chaves, G. La antracnosis. In: Schwartz; H.F.; Galvez, G.E. (eds) *Problemas de producción del frijol*. Cali (1980) 37-53.

Choquer, M.; Lee, M. H.; Bau, H. J.; Chung, K. R. Deletion of a transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. *FEBS Letters* 581 (2007) 489-494.

Colot, H.; Park, G.; Jones, J.; Turner, G.; Borkovich, K.; Dunlap, J. C. High throughput knockout of transcription factors in *Neurospora* reveals diverse phenotypes. PNAS 103 (2006) 10352-10357.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. Acesso em: 6 jan. 2011.

Coste, A. T.; Mark, R.; Ischer, F.; Sanglard, D. Divergent functions of three *Candida albicans* zinc- cluster transcription factors (CTA4, ASG1 and CTF1) complementing pleiotropic drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 154 (2008) 1491–1501.

Damasceno, K.J.; Silva, E.A.; Ishikawa, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. Journal Phytopathology 155 (2007) 241-247.

Del Sorbo, G.; Schoonbeek, H.J.; De Waard, M.A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genetics and Biology 30 (2000)1-15.

De Waard, M.A. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. Pesticide Science 51(1997) 271–275.

Doehlemann, G.; Molitor, F. & Hahn, M. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. Fungal Genetics and Biology 42 (2005) 601–610.

Dowzer, C.E.A.; Kelly, J.M. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology 11 (1991) 5701–5709.

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

Edginton, L. V.; Khew, K. L.; Barron, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology. 61 (1971) 42-44.

EMBRAPA, disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br/>, acessado em: 6 jan. 2011.

Fernández-Luqueño, F.; Reyes-Varela, V.; Martínez-Suárez, C.; Salomón-Hernández, G.; Yáñez-Meneses, J.; Ceballos-ramírez, J. M.; Dendooven, L. Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Bioresource technology, 2009.

Flaishman, M. A.; Hwang, C-S.; Kolattukudy, P. E. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. Physiological and Molecular Plant Pathology 479 (1995) 103–117.

Fling, M.E.; Kopf, J.; Tamarkin, A.; Gorman, J.A.; Smith, H.A.; Koltin, Y. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. Molecular and General Genetics 227(1991) 318–329.

- Forment, J.A.; Flipphi, M.; Ramón, D.; Ventura, L.; Maccabe, A. P. Identification of the *mstE* Gene Encoding a Glucose-inducible, Low Affinity Glucose Transporter in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* 28 (2006) 8339-8346.
- Freeman, S.; Nizani, F.; Dotan, S.; Even, S.; Sando, T. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse and field conditions. *Plant Disease* (1997) 749-752.
- Fu, J.; Hettler, E.; Wickes, B. L. Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology* 43 (2006) 200-212.
- Gaur, M.; Nidhi, P.; Manoharla, P.; Rai, V.; Mukhopadhyay, G.; Choudhury, D. et al., MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics* 9 (2008) 1-12.
- Griffith, J. K.; Baker, M.E.; Rouch, D.A.; Page, M.G; Skurray, R.A.; Paulsen, I.T.; Chater, K. F.; Baldwin, S.A.; Henderson, P.J. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Current Opinion in Cell Biology* 4 (1992) 684-695.
- Hamamoto, H.; Hasegawa, K.; Nakaune, R.; Lee, Y.J; Makizumi, Y.; Akutsu, K.; Hibi, T. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol14 alpha-demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 3421-3426.
- Hayashi, K.; Schoonbeek, H.; De Waard, M. A. Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73 (2002) 110-121.
- Jouhyun, J.; Jae-Seong, Y.; Sanguk, K. Integration of Evolutionary Features for the Identification of Functionally Important Residues in Major Facilitator Superfamily Transporters. *PLoS Computational Biology* 5 (2009) 1-12.
- Kalderon, D.; Roberts, B.L.; Richardson, W.D.; Smith A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39 (1984)499-509.
- Kaplan, L. Archeology and domestication in american *Phaseolus* (beans). *Economy Botany*. 19 (1965) 398.
- Kapoor, K.; Rehan, M.; Kaushiki, A.; Pasrija, R.; Lynn, A. M. Rational Mutational Analysis of a Multidrug MFS Transporter CaMdr1p of *Candida albicans* by Employing a Membrane Environment Based Computational Approach. *PLoS Computational Biology* 5 (2009) 1-11.
- Kapoor K, Rehan M, Lynn AM, Prasad R. Employing Information Theoretic Measures and Mutagenesis to Identify Residues Critical for Drug-Proton Antiport Function in Mdr1p of *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 5 (2010) 1-10.
- Kim, S. K. *C. elegans*: Mining the functional genomic landscape. *Nature Reviews* 2 (2001)681-689.

- Kimati, H. Fungicidas. In: Manual de Fitopatologia. 2 ed. São Paulo: Ceres, Piracicaba, v.1, p.325-373, cap.18, 1978.
- Kretschmer, M.; Leroch, M.; Mosbach, A.; Walker, A. S.; Fillinger, S. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. PLoS Pathogens 5 (2009) 1-13.
- Kupfer, D. M.; Drabenstot, S. D.; Buchanan, K. L.; Lai, H.; Zhu, H.; Dyer, D. W.; Roe, B. A.; Murphy, J. W. Introns and splicing elements of five diverse fungi. Eukaryotic Cell 3 (2004) 1088-1100.
- Law, C. J.; Maloney, P. C.; Wang, Da-Neng. Ins and outs major facilitator superfamily antiporters. Annual Review Microbiology 62 (2008) 289-305.
- Lévesque, C. A.; Brouwer, H.; Cano, L.; Hamilton, J. P.; Holt, C.; Huitema, E. et al., Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biology 11 (2010) 1-22.
- Liu, Z-M., and Kolattukudy, P. E. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. Journal of Bacteriology 180(1998)3592–3597.
- Macpherson, S.;Larochelle, M.; Turcotte, B. A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 10 (2006) 583-604.
- Madi, L.; McBride, S. A. ; Bailey, L.A ; Ebbole, D.J. *rco-3*, a Gene Involved in Glucose Transport and Conidiation in *Neurospora crassa*. The Genetics Society of America. 146 (1997) 499-508.
- Marmostein, R.; Carey, M.; Ptashne, M.; Harrison, S. C. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. Nature 356 (1992) 408-414.
- Münch, S.; Lingner, U.; Floss, D.S.; Ludwig, N.; Sauer, N.; Deising, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. Journal of Plant Physiology. 165 (2008) 41-51.
- Needleman, R. Control Maltose synthesis in yeast. Molecular and Cellular. Biology. 5(1991) 2079-2084.
- Nehls, U.; Wiese, J.; Guttenberg, M.; Hampp, R. Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. Molecular Plant-Microbe Interactions. 11 (1998) 167-176.
- Nelissen, B.; De Wachter, R.; Goffeau, A. Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 21 (1997) 113-114.
- O'Connell, R. J.; Bailey, J. A.; Richmond, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. Physiology Plant Pathology 27 (1985)75–98.

O'Connell, R. J.; Pain, N. A.; Hutchison, K. A.; Jones, G. L., and Green, J.R. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microscopy* 181 (1996) 204–212.

Oliari, L.; Vieira, C.; Wilkinson, R. E. Physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Plant Disease Report* 57 (1973) 870-872.

Oliveira, E. A.; Antunes, I. F.; Costa, J. G. C. da. Variação em patogenicidade do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Pelotas: IPEAS, 1973. 5 p. (Comunicado Técnico).

Oliveira, M. C.; Araújo, E.F.; Queiroz, M.V. Clonagem e sequenciamento de fragmentos aleatoriamente amplificados em *Colletotrichum lindemuthianum*. (2006) In: XV Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Viçosa Resumo do XV Simpósio de Iniciação Científica da UFV.

Ozcan, S.; Johnston, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Molecular and Cellular Biology*. 63 (1999) 554-569.

Page, R.D.M. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in Biosciences*. 12 (1996) 357–358.

Pan, S. Q.; Ye, X.S.; Kuc, J. Soluble carbohydrate levels in tobacco systemically protected against blue mold by stem injection with *P. tabacina* or leaf inoculation with Tobacco Mosaic Virus. *Phytopathology*. 83 (1993) 906-909.

Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H. Major facilitator superfamily. *Microbiology Molecular Biology Review*, 62 (1998). 1-34.

Paula Júnior, T. J.; Zambolim, L. Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J. de; Borém, A. Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais. Viçosa (1998) 375-433.

Paulsen, I.T.; Skurray, R.A. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes – an analysis. *Gene*, 132 (1996) 155-166.

Peplow, A. W.; Meek, I. B.; Wiles, M. C.; Phillips, T. D.; Beremand, M. N. *Tri16* Is Required for Esterification of Position C-8 during Trichothecene Mycotoxin Production by *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (2003) 5935 - 5940.

Pitkin, J.W.; Panaccione, D .G.; Walton, J.D. Aputative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology* 142(1996)1557–1565.

Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemans, M. A.; Pouwels, P. H.; Van Den Hondel, C. A. M. J. J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56 (1987) 117-124.

Perfect, S. E.; Hughes, H. B.; O'Connell, R. J.; Green, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. *Fungal Genetic Biology*, 27 (1999) 186–198.

Rava, C.A.; Purchio, A.F.; Sartorato, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijão comum. *Fitopatologia Brasileira* 19 (1994) 167-72.

Rava, C.A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. *Summa Phytopathologica* 28 (2002) 65-69.

Reis, E.M.; Forcelini, C.A.; Reis, C.A. Manual de Fungicidas: guia para controle químico de doenças de plantas. 4a. ed. Ampl. e rev. Florianópolis, Insular (2001) 176 p.

Roca, M.G.; Davide, L.C.; Mendes-Costa, M.C. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology* 40 (2002) 138-145.

Rodriguez-Guera, R.M.T.; Ramirez-Rueda, et al. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology* 52 (2003) 228-235.

Saier, M. H., Jr. Phylogenetic approaches to the identification and characterization of protein families and superfamilies. *Microbial and Comparative Genomics* 1 (1996) 129-150.

Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

Santos, C. M. A. Isolamento e caracterização do gene *mfs1* que codifica um transportador de membrana da família MFS em *Colletotrichum lindemuthianum*. (2010) Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 61p.

Schwartz, H. F. Anthracnose. In: Hall R, *Compendium of Bean Diseases*. St. Paul, (1991) 16-17.

Silva, K. J. D. Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG (2004) 86.

Silva, K. J. D.; de Souza, E. A.; Ischikawa, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal Phytopathology*. 155 (2007) 241-247.

Soares, M. A. Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum. (2007) Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 210p.

Soontornngun, N.; Laroche, M.; Drouin, S.; Robert, F.; Turcotte, B. Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Molecular and Cellular Biology*. 27 (2007) 7895–7905.

- Specht, C. A.; DiRusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. A method for extracting high molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry* 119 (1982) 158-163.
- Stergiopoulos, I.; Gielkens, M. M.; Goodall, S.D.; Venema, K.; Waard, M.A. Molecular cloning and characterization of three new ABC transporter encoding genes from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Gene* 289(2002) 141-149.
- Swo Vord, D.L. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (2002).
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24 (2007) 1596-1599.
- Than, P.; Prihastuti, H.; Phoulivong, S.; Taylor, P.W.J.; Hyde, K.D. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 9 (2008) 764-778.
- Tilburn, J.; Sarlar, S.; Widdick, D.A.; Espeso, E.A.; Orejas, M.; Mungroom, J.; Penalva, M.; Arst, H.N.J. The Aspergillus PacC zing finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline expressed genes by ambient pH. *EMBOJ* 14 (1995) 779–790.
- Upchurch R. G.; Rose, M. S.; Eweida, M. Over-expression of the cercosporin facilitator protein, CFP, in *Cercospora kikuchii* up-regulates production and secretion of cercosporin. *FEMS Microbiology Letters* 204 (2001) 89–93.
- Van Belle, D.; Bruno, A. A genomic view of yeast membrane transporters. *Current Opinion in Cell Biology*. 13 (2001) 389–398.
- Van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, et al. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*. 26 (2008) 1161 – 1168.
- Vieira, C. *Doenças e pragas do feijoeiro*. Viçosa (1988) 231.
- Vieira, C.; Júnior, T. J. P.; Borém, A. *Feijão*, 2nd. Viçosa: Editora – UFV (2006) 600.
- Voegelé, R. T.; Struck, C.; Hahn, M.; Mendgen, K. The role of haustoria in sugar uptake during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *PNAS*. 98 (2001) 8133-8138.
- Voss, T.; Schulte, J.; Tudzynski, B. A new MFS-transporter gene next to the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* is not involved in gibberellin secretion. *Current Genetics* 39 (2001) 377–383.
- Wahl, R.; Wippel, K.; Goos, S.; Kämper, J.; Sauer, N. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biology* 8 (2010) 1-10.

Wei, H.; Vienken, K.; Weber, R.; Bunting, S.; Requena, N.; Fischer, N. A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genetics and Biology* 41 (2004) 148-156.

Wieczork, R.; Krampe, S.; Weier, T.; Freidel, K.; Hollenberg, C. P.; Boles, E. Concurrent knockout of at least 20 transporters genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*. 464 (1999) 123-128.

Yin, Y.; He, X.; Szewczyk, P.; Nguyen, T.; Chang, G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* 312 (2006) 741–744.

Yokoyama, L.P.; Stone, L. F. *Cultura do feijoeiro no Brasil: Característica da Produção*. Embrapa Arroz e Feijão (2000) 75p.