

MARCOS ANTÔNIO SOARES

**GENES DETERMINANTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA E
ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA MITOCONDRIAL DE *Colletotrichum
lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO
COMUM**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

MARCOS ANTÔNIO SOARES

GENES DETERMINANTES DE PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA E ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA MITOCONDRIAL DE *Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO COMUM

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

APROVADA: 23 de março de 2007

Prof^a Elza Fernandes de Araújo

(Co-orientadora)

Prof^o Everaldo Gonçalves de Barros

(Co-orientador)

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Prof^a Elaine Aparecida de Souza

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz

(Orientadora)

A minha querida **mãe**, meu **pai** e **irmãos**,
pelo carinho, confiança, compreensão, e
suporte nas horas difíceis.

- **Ofereço** -

Para aquela que acreditou no meu trabalho;
incentivou-me em todos os momentos do
meu doutorado, mesmo nos mais difíceis;
esteve sempre presente com seu carinho,
dedicação, atenção, e orientou-me da forma
mais humana e responsável, Prof.^a Marisa
Vieira de Queiroz

- **Dedico** -

AGRADECIMENTOS

Eu não posso deixar de registrar alguns agradecimentos a pessoas que tiveram uma participação, mesmo que indiretamente, na conclusão deste trabalho. Essa é uma vitória que deve ser compartilhada com:

À força que nunca seca, que me guiou em diferentes momentos da minha vida; capacitando-me a ultrapassar obstáculos e a buscar sempre o aprimoramento como Ser Humano;

À minha família, representada pela minha Mãe, que mesmo à distância sempre acreditou e apoiou-me nos bons e maus momentos;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no Brasil e na França;

À Universidade Federal de Viçosa pelos 11 anos marcantes da minha vida;

Ao Departamento de Microbiologia pelo acolhimento, incentivo acadêmico, e facilidade de trabalho em equipe;

À professora, orientadora e estimada amiga Professora Marisa, pelos seis anos de orientação, ensinamentos, confiança e dedicação, que marcaram minha formação profissional e pessoal;

Ao professor Thierry Langin pela credibilidade, incentivo e agradável acolhida no seu laboratório no IBP, França;

Ao pesquisador Richard Laúge pelos momentos de bancada, pela orientação, pelos cafés, pelas discussões, pela credibilidade, e por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa de forma carinhosa;

À professora Elza pela disponibilidade em auxiliar, e pelo exemplo de garra com a qual assume seus compromissos;

À professora Célia pela diplomacia e pelo incentivo em todos os momentos que necessitei do seu auxílio, além da grande dedicação ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola;

Aos professores da banca pela participação e valiosas sugestões e discussões. Em especial ao professor Everaldo por sempre estar disponível em todos os momentos que o procurei;

Aos demais professores do Departamento que tornaram a busca pelo conhecimento mais agradável e facilitada; em especial aos professores Tótola e Catarina, que marcaram positivamente minha iniciação científica;

Ao professor Lúcio Campos, a quem tenho uma enorme admiração pela enorme contribuição na minha formação acadêmica;

A todos do Laboratoire de Phytopathologie Moléculaire (França) pelo carinho, atenção e preocupação que dispensaram a mim, principalmente às “Françoises”, Éugenie, Catherine, Coco e Denise;

Um agradecimento, sem limites, se faz necessário a Carlos, Nacho, Fernanda, Amelie (Amélia Carla), Arno, Perrine e Mathilde, sem os quais eu talvez não tivesse suportado algumas adversidades da vida. Talvez eu ainda não tenha a verdadeira noção do papel fundamental que vocês tiveram na minha vida em Paris;

A Dyana e William, “irmãos” que encontrei durante a trajetória da minha vida e que mesmo à distância são indispensáveis e insubstituíveis pelas suas enormes qualidades que eu tanto admiro e eu não tenho palavras que expressem tudo que gostaria de dizer-lhes nesse momento;

Aos meus grandes e adoráveis amigos Klédna e Gilvan, que fiz durante o meu curso de doutoramento, pelas discussões, conversas sempre agradáveis, pelos vários cafés, confidências, sorrisos de afeto, palavras confortantes nos momentos difíceis que enfrentamos no dia-a-dia do laboratório e fora do mesmo, sem esquecer obviamente do período do meu retorno ao laboratório. Foi um prazer trabalhar ao lado de vocês;

Às minhas tão queridas amigas Miriam e Wanessa, pelo carinho, dedicação, cumplicidade, companheirismo, apoio incondicional, pela receptividade após meu retorno da França e pelas sextas-feiras à noite. Vocês foram muito importantes, juntamente com a Klédna, em fases decisivas da minha vida;

Aos meus amigos de república Marcos, Manu e Mário pela paciência, preocupação e incentivo na reta final do doutorado;

Ao Cláudio pelo companheirismo, dedicação, carinho, incentivo na fase de redação da tese e por me fazer acreditar que é possível;

A Swiany pela enorme dedicação, companheirismo, e auxílio durante a concretização de diversos experimentos deste trabalho;

A Ireninha pelo seu excelente bom humor e disponibilidade em me auxiliar nas impressões e trâmites finais;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos pela convivência agradável de trabalho: Jildete, Klédna, Gilvan, Swiany, Ronney, Vivi,

Daniel, Maycon, Lara, Rodrigo Barros e da BQI, Rafael, Leonardo, Michelle, Leandro, Maurílio, Denise, João Batista, Jorge e Patrícia;

Aos amigos e colegas dos laboratórios de Ecologia Microbiana, Micorriza, Fisiologia e Microbiologia Industrial que sempre me socorreram nas horas apertadas de ponteiras autoclavadas, placas de Petri, capelas, reagentes, aparelhos e obviamente pelas horas divertidas que dividimos. Agradeço a todos vocês representados por: Patrícia Pimentel, Tânia, Cyntia, Chellen, Dani, Gilmara, Lydice, André, Zé Carlos, Néia, Wendel e Agenor;

Ao casal Patrícia e Mauro pelas horas agradáveis de conversa e descontração;

Aos funcionários do departamento que de diferentes formas contribuíram positivamente no meu trabalho, principalmente Nilcéia, Aparecida, Laura, Sr. Raimundo, Toninho, Danilo e Evandro;

Aos vários colegas que fiz em Viçosa que tornaram minha trajetória nessa cidade inesquecível e extremamente agradável;

E a todos de uma forma ou de outra tiveram participação nessa minha vitória...

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1. Feijoeiro: origem e importância econômica.....	1
2. Antracnose do feijoeiro.....	3
3. Processo de infecção do <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	5
4. Raças fisiológicas em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	7
5. Variabilidade genotípica em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e suas relações filogenéticas.....	8
6. Genoma mitocondrial de fungos filamentosos.....	10
7. Genes de patogenicidade e virulência na interação planta-patôgeno.....	12
7.1 - Genes envolvidos com a adesão, germinação e penetração.....	14
7.2 Genes envolvidos no crescimento biotrófico e necrotrófico.....	19
8 - Influência do pH ambiental na patogênese.....	22
9 - Isolamento de genes de patogenicidade via mutagênese.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO DE MUTANTES DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> DEFICIENTES NA INFECÇÃO DO FEJJOEIRO POR MEIO DE REMI (INTEGRAÇÃO MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO) E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES INATIVADOS.....	49
1. RESUMO.....	50
2. INTRODUÇÃO.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	54
3.2. Isolamento de ácidos nucleicos.....	54
3.3. Transformação do <i>C. lindemuthianum</i>	54
3.4. Testes de patogenicidade.....	55
3.5. Observação do processo infeccioso por microscopia de fluorescência.....	56
3.6. Recuperação do plasmídeo.....	56
3.7. Sequenciamento de DNA e análise das seqüências.....	56
3.8. Experimentos de RT-PCR.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Eficiência da transformação de <i>C. lindemuthianum</i>	59
4.2. Detecção de linhagens mutantes.....	62
4.3. Cinética da infecção dos mutantes mut5, mut29 e mut65 em hipocótilos excisados de plantas de feijoeiro.....	64

4.3.1 Cinética de infecção da linhagem mutante mut5.....	67
4.3.2 Cinética de infecção da linhagem mutante mut29.....	70
4.3.3 Cinética de infecção da linhagem mutante mut65.....	72
4.3.4 Sintomas macroscópicos x microscópicos.....	73
4.4. Recuperação do plasmídeo das linhagens mutantes.....	74
4.4.1 Plasmídeo pRescue2 do mutante mut65.....	76
4.4.2 Plasmídeos pRescue7e pRescue16 obtidos do mutante mut29.....	82
4.4.2.1 Análise do plasmídeo pRescue7.....	82
4.4.2.2 Análise do plasmídeo pRescue16.....	88
4.5. Regulação dos genes recuperados utilizando-se RT-PCR.....	93
4.5.1 Transcrição do gene <i>thfCl</i> putativo.....	93
4.5.2 Transcrição do provável gene que codifica o transportador MSF (<i>msfCl</i>) e a fosfolipase C (<i>plcCl</i>).....	94
5. CONCLUSÕES.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CAPÍTULO 2 – REGULADOR TRANSCRICIONAL PacC INFLUENCIA A PATOGENICIDADE DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	103
1. RESUMO.....	104
2. INTRODUÇÃO.....	106
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	110
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	110
3.2. Isolamento de ácidos nucleicos.....	110
3.3. Isolamento dos clones de cDNA.....	111
3.4. Construção do vetor de inativação.....	111
3.5. Obtenção dos mutantes <i>pacCl</i> ⁻	112
3.6. Testes de patogenicidade.....	113
3.7. Observação do processo infeccioso por microscopia de fluorescência.....	113
3.8. Sequenciamento de DNA e análise das seqüências.....	113
3.9. Experimentos de PCR e RT-PCR.....	114
3.10. Northern Blot.....	115
3.11. Influência do <i>pacCl</i> na produção e secreção de lípase.....	115
3.12. Medida do pH apoplastico na folhas de feijoeiro da cultivar susceptível La Victoire e da cultivar resistente Jalo.....	116
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
4.1. Análise do cDNA do <i>pacCl</i>	117
4.2. Influência do pH ambiental na expressão do gene <i>pacCl</i>	131
4.3. Deleção funcional do locus <i>pacCl</i>	132
4.4. PacCl é necessário para o crescimento vegetativo em pH alcalino.....	134
4.5. PacCl é um fator de patogenicidade em <i>C. lindemuthianum</i>	138

4.6. Transcrição do gene <i>pacCl</i> durante a cinética de infecção.....	145
4.7. Influência da mutação no gene <i>pacCl</i> na atividade enzimática de lipase.....	146
4.8. Genes <i>pala</i> e <i>palF</i> envolvidos na transdução de sinal ativada por pH ambiental.....	147
5. CONCLUSÕES.....	158
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
CAPÍTULO 3 – SEQÜÊNCIA PARCIAL DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO FITOPATOGÊNICO <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	165
1. RESUMO.....	166
2. INTRODUÇÃO.....	167
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	169
3.1. Linhagens e condições de cultura.....	169
3.2. Manipulações de DNA, construção de banco genômico.....	169
3.3. Amplificação da região ITS do rDNA por PCR.....	170
3.4. Seleção de DNA repetitivo a partir do banco genômico e hibridizações.....	170
3.5. Sequenciamento e análise das seqüências.....	171
3.6. Análises filogenéticas.....	171
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	173
4.1. Isolamento de DNA repetitivo.....	173
4.2. Análise da seqüência do fragmento F14.1.....	173
4.2.1 Conteúdo gênico.....	173
4.2.2 Seqüências codificadoras.....	176
4.2.3 Genes que codificam tRNA.....	183
4.2.4 Possíveis elementos reguladores.....	185
4.2.5 Uso de códons preferenciais.....	186
4.2.6 Ordem dos genes do genoma mitocondrial parcial de <i>C. lindemuthianum</i>	187
4.2.7 Análise filogenética.....	189
5. CONCLUSÕES.....	192
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	193

RESUMO

SOARES, Marcos Antônio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.
Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Orientadores: Elza Fernandes de Araújo, Everaldo Gonçalves de Barros e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Colletotrichum lindemuthianum é um dos principais patógenos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em regiões tropicais. Nesse trabalho são descritos três mutantes de *C. lindemuthianum* obtidos por mutagênese insercional usando a técnica REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição), com a capacidade alterada de infectar o hospedeiro, e a caracterização parcial dos genes mutados; é determinado o papel do gene *pacCI* no crescimento vegetativo e na patogenicidade; além da caracterização parcial do genoma mitocondrial desse fitopatógeno. A utilização de enzima de restrição *NarI* na transformação de *C. lindemuthianum* aumentou aproximadamente 10X a eficiência de transformação com o plasmídeo pAN7.1. Os mutantes mut5, mut29 e mut 65, isolados do banco de 580 transformantes, apresentaram alteração na capacidade de infecção do feijoeiro. Não foi observada a penetração das linhagens mut29 e mut65 no tecido do hipocótilo, apesar dessas linhagens causarem sintomas da antracnose nas folhas do feijoeiro. Esse resultado indica que as linhagens mut29 e mut65 apresentam fenótipo variável de acordo com o tecido vegetal utilizado nas observações de infecção. Após o sequenciamento dos plasmídeos recuperados de mut29 e mut65, pôde-se comprovar que a integração do vetor pAN7.1 foi mediada pela enzima *NarI*, o que caracteriza eventos REMI. As análises das seqüências mostraram que o gene que codificam tetrahidrofolato sintase (*tlsCI*) foi interrompido pelo vetor no mut65. Um putativo gene codificador para fosfolipaseC (*plcCI*) está etiquetado no mut29. Essa ultima linhagem possui uma segunda integração na região terminal 3' do gene com homologia ao transportador do tipo MSF (*msfCI*). Esse é o primeiro relato desses genes em *C. lindemuthianum*. Os fatores de transcrição da família PacC/Rim101 de fungos e leveduras são responsáveis pela ativação ou repressão de genes em resposta ao pH extracelular. A ativação desses fatores de transcrição depende de uma via de transdução de sinal capaz de perceber variações do pH externo, e transmitir esse sinal até a ativação do fator de transcrição. Foi descrita a seqüência do cDNA do gene *pacCI*, isolada a

partir de uma banco genômico de EST de *C. lindemuthianum*. A proteína predita de 581 aminoácidos possui alta similaridade com proteínas da família de reguladores de transcrição PacC/Rim101 e sua região N-terminal possui 3 motivos dedo de zinco, do tipo Cys₂Hys₂. A transcrição de *pacCl* aumentou à medida que o pH ambiental tornou-se mais alcalino. O crescimento do mutante nulo *mutpac2* foi inibido em ambientes mais alcalinos, apresentando secreção de pequena quantidade de lipase, e este não foi capaz de causar maceração do tecido do hospedeiro, indicando o seu papel na patogenicidade de *C. lindemuthianum*. A transcrição de *pacCl* foi detectada por RT-PCR na linhagem selvagem, 18 h após a inoculação de plantas de feijoeiro e aumentou progressivamente com a biomassa fúngica durante a cinética de infecção. Outros dois cDNAs, codificando proteínas homólogas às famílias protéicas PalA/Rim20 e PalF/Rim8 de fungos e leveduras, que fazem parte da via de transdução de sinais, também foram descritos. A detecção de genes regulados positivamente por PacCl, na transição da fase biotrófica para a necrotrófica, poderá auxiliar o entendimento dos mecanismos moleculares que levam a essa transição em fungos hemibiotrófico, e, conseqüentemente, a proposição de estratégias de controle da doença. Utilizando-se uma técnica de hibridização diferencial capaz de identificar DNA altamente repetido, foi isolado um fragmento de 9.456 pb correspondendo à seqüência parcial do genoma mitocondrial de *C. lindemuthinum*. Esse fragmento possui alto conteúdo A+T (66%), e nele estão presentes os genes *cox1*, *cox3*, *nad6*, *rnl*, *rns*, e 12 outros genes codificando para tRNA. Os genes codificadores de proteínas nesse fragmento utilizam códons preferenciais. Somente o gene *cox1* foi interrompido por um intron do grupo I contendo uma ORF para endonuclease do tipo LAGLIDADG, envolvida no processo de “homing”. A comparação da sintenia dos genes presentes nesse fragmento e análise filogenética utilizando-se três proteínas mitocondriais concatenadas de diversos fungos agrupou *C. lindemuthianum* com outros fungos da ordem Filacorales.

ABSTRACT

SOARES, Marcos Antônio, D.Sc., Universidade de Viçosa, March, 2007.
Pathogenicity and virulence determinant genes and partial analysis of the mitochondrial genome of *Colletotrichum lindemuthianum*, causal agent of anthracnose of common bean. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo, Everaldo Gonçalves de Barros and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Colletotrichum lindemuthianum is one of the main pathogens affecting common bean (*Phaseolus vulgaris*) in tropical regions. In the present work we describe three mutants of *C. lindemuthianum* obtained by insertional mutagenesis using the REMI technique (Restriction Enzyme-Mediated Integration). The mutants were selected based on their lower virulence/pathogenicity and the partial characterization of the mutated genes is presented. In addition, the mitochondrial genome of this phytopathogen was partially characterized. The results show that the gene *pacC1* plays a role in vegetative growth and pathogenicity. The use of the restriction enzyme *NarI* in the transformation of *C. lindemuthianum* increased approximately 10-fold the transformation efficiency using plasmid pAN7.1. Mutant strains mut5, mut29, and mut65 were isolated from a total of 580 transformants based on their altered ability to infect susceptible bean plants. Strains mut29 and mut65 failed to penetrate hypocotyl tissues of the common bean, but caused anthracnose symptoms on mature leaves. This result indicates that strains mut29 and mut65 show a phenotype that varies according to the type of vegetal tissue used in the infectivity tests. The sequence of the plasmids recovered from strains mut29 and mut65 showed that the integration of vector pAN7.1 was indeed mediated by the restriction enzyme *NarI*, thus characterizing REMI events. Sequence analysis showed that the gene coding for the enzyme tetrahydrofolate synthase (*tlsC1*) was interrupted by the transformation vector in strain mut65. On the other hand, a gene putatively coding for a phospholipase C (*plcC1*) was tagged in strain mut29. In addition, strain mut29 showed a second integration event at the 3' terminal region of a gene showing sequence similarity to a MSF transporter (*msfC1*). This constitutes the first report of these genes in *C. lindemuthianum*. The third mutant, mutpac2, was tagged to an interruption of gene *pacC1*, showing sequence similarity to a transcription factor of the family PacC/Rim101 of fungi and yeast. This family of transcription factors is responsible for gene activation or repression in response to

extracellular pH. The activation of these transcription factors depends on a signal transduction pathway capable of detecting external pH variations and then transmits the signal until the activation of the transcription factor. The cDNA sequence of gene *pacCl* was obtained from a *C. lindemuthianum* EST data bank. Its predicted protein has 581 amino acids and shows high sequence similarity to proteins from the family of transcription regulators PacC/Rim101; its N-terminal region has three Zinc-finger motifs of the type Cys₂Hys₂. We show that the level of *pacCl* transcript accumulation increased with more alkaline extracellular pH. Growth of the *pacCl* null mutant, *mutpac2*, was inhibited in alkaline environments and secreted small amounts of lipases. This mutant proved unable to macerate host tissues, thus indicating the role of this gene in the pathogenesis of *C. lindemuthianum*. Transcription of *pacCl* was detected by RT-PCR in the wild-type strain 18 hours after the inoculation of susceptible host plants and was progressively increased accompanying fungal biomass during infection kinetics. Another two cDNAs coding for proteins homologous to members of the protein family PalA/Rim20 and PalF/Rim8 of fungi and yeast were described as well. These proteins also participate in signal transduction pathways. The detection of genes positively regulated by PacCl during the transition from the biotrophic to the necrotrophic stages of the *C. lindemuthianum*'s life cycle may aid in understanding the molecular mechanisms involved in the switch process of hemibiotrophic fungi, and may consequently lead to the discovery of alternative control methods for anthracnose. Using a technique of differential hybridization able to identify highly repetitive DNA, we isolated and sequenced a 9,456 bp fragment corresponding to part of the mitochondrial genome of *C. lindemuthianum*. This fragment showed a high A+T content (66%) and contained the genes *cox1*, *cox3*, *nad6*, *rnl*, *rns*, and 12 tRNA genes. The genes coding for proteins in this fragment showed preferential codon usage. Only the gene *cox1* was interrupted by a group I intron containing an ORF for an endonuclease of the type LAGLIDADG, involved in the homing process. A synteny comparison of the genes present in this fragment and their phylogenetic analysis using three concatenated mitochondrial proteins of several fungal species grouped *C. lindemuthianum* with other fungi of the order *Phylachorales*.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Feijoeiro: origem e importância econômica

O feijoeiro comum pertence à divisão Angiospermae; classe Dicotyledoneae; subclasse Rosidae; ordem Rosales; família Fabaceae; subfamília Faboideae; tribo Phaseoleae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.); o feijão de lima (*P. lunatus* var. *lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem) e a espécie *P. polyanthus* (Vieira, 1988; Zimmermann et al., 1996).

O Novo Mundo é o local mais aceito para a origem do feijoeiro comum baseando-se em trabalhos arqueológicos, dados fitogeográficos e análises da variabilidade das isoenzimas de faseolina, principal proteína de reserva do feijão. Achados arqueológicos demonstraram que o feijoeiro era cultivado na América do Sul, região onde atualmente é o Peru, a 10.000 a.C. reforçando a hipótese da sua origem nas Américas. A localização exata de sua domesticação não é certa. Kaplan, baseando-se em dados arqueológicos datados de 7.000 a.C, propôs que ela teria ocorrido na Mesoamérica e posteriormente seu plantio teria sido disseminado para a América do Sul. Por outro lado, dados mais antigos, 10.000 a.C., apóiam que seu cultivo iniciou-se na América do Sul, e em seguida foi conduzido à Mesoamérica. Não se pode descartar a possibilidade de que os primeiros cultivos tenham ocorrido em diferentes pontos ao longo de toda área de ocorrência do feijoeiro selvagem (Kaplan citado por Zimmermann et al., 1996). Com a descoberta das Américas, seu cultivo e consumo dispersaram-se para todas as regiões do mundo. Atualmente, o feijão é cultivado praticamente em todos os países pela sua capacidade de adaptação às mais diferentes condições edafoclimáticas (Zimmermann et al., 1996).

O feijão destaca-se na alimentação humana por ser uma fonte rica não somente em proteínas, mas também pelo alto teor de lisina, carboidratos, sais minerais e fibras alimentares. Essa leguminosa representou em 2004 a 6º fonte de proteínas dos brasileiros, perdendo apenas para soja, trigo, carne de ave e bovina e leite (FAO). No Brasil, culturalmente esse alimento constitui um prato quase que

obrigatório para a população rural e urbana (Lajolo et al., 1996), destacando-se a região nordeste como maior consumidora no período de 2002-2003 (IBGE).

No Brasil, o cultivo do feijoeiro era realizado praticamente por pequenos produtores sendo considerada de subsistência. Dessa forma, sua produção era destinada ao consumo familiar e o excedente comercializado. Cerca de 90% da produção de feijão no Brasil era proveniente dos cultivos das “águas” e da “seca”, ambos de elevado risco sendo o principal fator que desestimulava a produção de feijão por grandes produtores (Borém et al., 1998).

Recentemente, essa cultura passou a ser cultivada no inverno principalmente por médios e grandes agricultores, que geralmente empregam uma forte mecanização e novas tecnologias, obtendo maior produtividade dessa lavoura (Yokoyama et al., 1996).

Durante todo o ano é possível encontrar regiões no Brasil nas quais haverá produção dessa cultura. Atualmente, o feijoeiro é plantado em todo território nacional, sendo colhidas três safras anuais. As sementes do feijão de primeira época, conhecida como safra das águas, são semeadas entre os meses de agosto de dezembro e o feijão é colhido entre os meses de dezembro a março, a colheita coincide com o período chuvoso. Esse cultivo é encontrado principalmente na Região Sul atingindo uma produção de 1.149.000 t na safra 2005/2006 (CONAB), e estima-se um aumento de 39,8% para o ano de 2007 (IBGE).

Na safra da seca ou de segunda época, o feijão é semeado entre os meses de janeiro e abril e colhido entre abril e agosto, período de seca no qual as chuvas são escassas, o que pode levar a um déficit hídrico nessa cultura (Borém et al., 1998). Esse cultivo abrange todos os estados brasileiros, rendendo 1.469.700 t no período 2005/2006 (CONAB) com uma projeção de aumento de 4,6% para o próximo ano (IBGE).

Por fim, a terceira safra, também chamada de inverno, a semeadura ocorre preferencialmente em meados de abril até final de maio, porém este cultivo amplia-se de meados de março até final de julho, e a colheita ocorre entre os meses de agosto e outubro. Essa safra gerou 854.500 t para o Brasil no período 2005/2006 (CONAB), e no ano de 2007 espera-se um aumento de 7,2% na sua produção (IBGE).

Os rendimentos médios (Kg/ha) das safras das águas e seca foram 724 e 866 no ano de 2006, respectivamente; sendo o rendimento da safra de inverno mais do que o dobro das safras anteriores, chegando à 1997 Kg/ha (IBGE). De forma

generalizada, as safras das águas e o da seca são cultivados de forma tradicional por pequenos e médios produtores, ao contrário da cultura de inverno, na qual os produtores são altamente tecnificados, o que explica a diferença sensível de rendimento entre as diferentes culturas (Yokoyama et al., 1996.). Devido à possibilidade de obtenção de feijão com alta sanidade, o cultivo de inverno deveria ser direcionado à produção de sementes. Deve-se ressaltar que, historicamente, essa safra tem obtido os melhores preços do mercado.

As regiões Nordeste, Sul e Sudeste são as maiores produtoras de feijão no Brasil. O estado de Minas Gerais contribuiu com aproximadamente 15 % da produção nacional de feijão, sendo o segundo maior produto brasileiro, produzindo 536.600 t no período 2005/2006, o que demonstra a importância desse grão na economia do estado (CONAB).

O Brasil, a Índia e a Nigéria são os maiores produtores mundiais de feijão, mas com índices de produtividade bem diferentes. Países como Irlanda e Países Baixos obtiveram produtividade maior que 4000 Kg/ha em 2005, possivelmente influenciada por fatores como o grau de tecnologia aplicada ao cultivo (FAO).

Diversos aspectos interferem positivamente ou negativamente na produção desse grão, como: extensão da área plantada; sistema de armazenamento, métodos de cultivo, utilização ou aplicação incorreta de fertilizantes, além do emprego de variedades com características melhoradas para que possam suportar bem adversidades abióticas e sejam resistentes aos fitopatógenos. A falta de nutrientes no solo seja por carência, ou mesmo por adubação inadequada; cultivo associado a outras culturas; ataque de pragas, e incidência de diversas doenças são as principais variáveis que concorrem para a baixa produtividade do feijoeiro no Brasil (Vieira, 1988).

2. Antracnose do feijoeiro

As doenças causadas por patógenos são uma das principais variáveis responsáveis pelo baixo rendimento da cultura do feijoeiro no Brasil. A cultura está sujeita as perdas causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides associados ou não. Os prejuízos serão maiores ou menores em função de diversos fatores, entre

eles, temperatura, umidade relativa do ar e condições inerentes à própria planta, podendo certas doenças causar maiores danos que outras.

A antracnose é uma das doenças mais comuns e severas do feijoeiro, acarretando grandes perdas na produção. Sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dessa doença, tais como alta umidade e temperaturas entre 18 a 20 °C, a produtividade é drasticamente reduzida (Vieira, 1998). Além de ocasionar perdas durante o transporte e armazenagem dos grãos, abatendo substancialmente o valor econômico dos mesmos, torna-os inadequados para o consumo humano. Essa doença está presente em todos os continentes, e 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 (Pria et al., 1999).

O agente causal da antracnose é um fungo filamentosos, cuja forma assexuada recebe o nome de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi & Cavara, pertencente ao reino Fungi, divisão Ascomycota, do subfilo Pezizomycotina e classe Sordariomycetes. Sua forma sexuada, *Glomerella cingulata* f sp. *phaseoli* (sinônimo *G. lindemuthiana* Shear), é capaz de formar peritécios férteis em meio de cultura (Roca et al., 2003).

Esse patógeno afeta plantas de feijão em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes (Araújo, 1988). Plantas mais jovens geralmente são mais susceptíveis ao ataque desse fungo do que plantas adultas, assim como tecidos da planta menos lignificados.

Após a germinação das sementes infectadas, podem-se observar lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo das plântulas. As lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras. Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escuras ou pardas, que atingem inicialmente as nervuras principais até as nervuras secundárias à medida que a doença progride. Nas vagens, as manchas são arredondadas, deprimidas e pardo-escuras com bordas salientes parda-avermelhadas. Quando as condições ambientais são favoráveis, forma-se uma massa de coloração rósea, no centro das lesões, que contém conídios (Pria et al., 1999).

A doença surge na lavoura pela presença do patógeno nos restos culturais ou pela utilização de sementes infectadas (Machado, 1994); quanto mais cedo a doença aparece no campo, maiores serão as perdas na produtividade. Práticas como rotação de cultura e utilização de sementes de boa procedência são formas eficazes de

controle da doença (Vieira, 1988). As perdas causadas na lavoura podem chegar a 100% em condições ambientais favoráveis ou quando são utilizadas sementes infectadas pelo patógeno (Guzman et al., 1979; Chaves, 1980).

Diferentes métodos podem ser utilizados no controle dessa doença. (Canteri et al., 1999). A utilização de variedades de feijoeiro resistentes à infecção por *C. lindemuthianum* é a forma menos onerosa em relação à aplicação de fungicidas na lavoura. O controle da qualidade e tratamento das sementes semeadas impede a entrada do patógeno nas áreas antes livres do fungo, diminuindo, conseqüentemente, o potencial de inóculo primário, levando à redução do uso de fungicidas na parte aérea. A rotação de cultura auxilia na redução do inóculo do patógeno no solo.

3. Processo de infecção do *Colletotrichum lindemuthianum*

Desde o contato inicial entre o hospedeiro e o patógeno até o aparecimento dos sintomas da doença, ocorrem diversas fases no processo de infecção, como a deposição do propágulo, germinação, penetração, estabelecimento das relações parasitárias estáveis e a colonização propriamente dita.

Pode-se definir o patógeno de planta como um organismo que completa parte ou todo seu ciclo de vida dentro da planta e, conseqüentemente, acarreta algum prejuízo para a mesma (Hammond-Kosack et al., 2000).

O fungo *C. lindemuthianum* é um fungo hemibiotrófico justamente por se comportar no início da fase de infecção como biotrófico, passando a necrotrófico nas fases finais da colonização do tecido hospedeiro (O'Connell et al, 1985). O conídio germina e emite o tubo germinativo cerca de 18h após a sua deposição sobre a folha do hospedeiro. Um apressório, de cor escura devido a sua melanização, é formado na ponta do tubo geminativo (Bailey et al., 1992). A partir dessa estrutura, diferencia-se a hifa peg de penetração que atravessa a parede celular da primeira célula vegetal. Enzimas hidrolíticas devem estar envolvidas nesse processo, já que ocorrem modificações químicas nas regiões das paredes celulares próximas ao peg. O fungo deve ter um forte controle na secreção de tais enzimas, pois a atuação das mesmas é localizada (O'Connell et al, 1985).

Uma estrutura globosa, chamada de vesícula de infecção, é diferenciada entre a parede celular e a membrana plasmática da célula epidermal (O'Connell et al,

1985). A formação dessa vesícula não ocasiona a morte da célula infectada. A sua função ainda não foi elucidada, mas pode estar envolvida com a manutenção da viabilidade da célula vegetal infectada e/ou com a supressão das respostas de defesa do hospedeiro compatível.

A partir da vesícula de infecção, diferencia-se uma hifa que tem seu crescimento entre a parede celular e a membrana plasmática das células epidermais e corticais, que permanecem vivas, apesar de sofrerem modificações estruturais no citoplasma. Cerca de 48 h após a infecção, observam-se rupturas no tonoplasto e plasmalema, culminando na completa desorganização do citoplasma dentro de 60 h, restando apenas fragmentos da membrana (O'Connell et al, 1985). Esse padrão de colonização das células do hospedeiro, no qual a célula vegetal é mantida inicialmente viva (fase biotrófica) seguida de degeneração celular, repete-se à medida que as hifas primárias vão invadindo as demais células vegetais.

A degeneração ocorrida no intervalo de 60 a 72 h pode ser observada apenas microscopicamente. Os sintomas macroscópicos aparecem depois de decorridas 96-120 h do início da infecção. Nesse estágio, a hifa primária alcança uma extensão máxima de dez células epidermais e quatro camadas celulares do córtex (O'Connell et al, 1985).

O micélio primário ramifica-se numa hifa secundária após 120 h. Além de possuir um diâmetro menor, a hifa secundária é capaz de crescer intercelularmente (pela parede celular ou pela lamela média), e até mesmo invadir o lúmen de células vegetais mortas (O'Connell et al, 1985). Essa é a fase necrotrófica típica, na qual as células infectadas e aquelas situadas a uma distância de até 250 μm , que ainda não foram invadidas, possuem o citoplasma modificado e são mortas.

O córtex do tecido vegetal está completamente colonizado pela hifa secundária após 6 a 8 dias. Os sintomas macroscópicos da antracnose tornam-se evidentes e característicos. Acérvulos rompendo a camada da epiderme vegetal são evidentes em aproximadamente 10 dias. Tais estruturas possuem uma massa de conídios com setas estéreis e melanizadas (O'Connell et al, 1985).

Quando a interação patógeno-hospedeiro é incompatível, a célula da epiderme, inicialmente infectada pelo peg, é morta juntamente com as estruturas fúngicas invasivas. Interessantemente, a morte celular é localizada; as demais células que não foram invadidas, mas que estão ao redor daquela infectada, permanecem viáveis. Não é observada a formação da vesícula de infecção, mas em 10% das

células mortas podem-se detectar estruturas semelhantes à hifa de infecção (O'Connell et al, 1985).

4. Raças fisiológicas em *Colletotrichum lindemuthianum*

Em 1911 houve o primeiro relato que diferentes variedades de feijão reagiam diferentemente quando inoculadas com isolados de *C. lindemuthianum*, demonstrando que esse patógeno possuía variação na sua patogenicidade (Barrus, 1911).

Um isolado obtido de uma região de New York foi capaz de causar doença em um grupo de cultivares, denominadas suscetíveis, mas em outras cultivares, ditas resistentes, os sintomas da doença não apareceram, pois a infecção de alguma forma foi abolida. Uma segunda linhagem, isolada de uma outra região dessa mesma cidade, foi inoculada nesses dois grupos de cultivares. Observou-se a resposta contrária em relação ao aparecimento ou não da doença. Com esses resultados foram descritas as duas primeiras raças de *C. lindemuthianum* denominadas de alfa e beta (Barrus, 1918). Alguns anos depois, no mesmo país, foram relatadas duas novas raças gama (Burkholder, 1923) e delta (Andrus et al., 1942).

Yerkes et al. (1956), trabalhando com diferentes isolados do México, relataram a presença da raça beta, já descrita nos EUA, e descreveu 10 novas raças. De acordo com as reações das variedades diferenciadoras utilizadas por esse autor (três americanas e cinco mexicanas), as novas raças foram divididas em três grupos: Mexicano I contendo seis raças (MA-1, MA-2, MA-3, MA-4, MA-5 e MA-6), Mexicano II contendo uma raça (MA-7) e Mexicano III contendo três raças (MA-8, MA-9 e MA-10). Yerkes (1958) descreveu mais três raças MA-11, MA-12 e MA-13, correspondentes à raça alfa, pois respondiam da mesma forma quando inoculadas nas variedades diferenciadoras. Na Europa foram descritas as raças epsilon, lambda, capa e iota (Blondet; Hubbeling; Schnock; Krüger e Hubbeling citados por Vieira, 1988).

Utilizando-se variedades diferenciadoras americanas, Oliveira et al. (1973) identificou o grupo Brasileiro I e Oliari et al. (1973) descreve o grupo Brasileiro II. Menezes (1985) realizou um trabalho extenso de caracterização de isolados brasileiros originados de 16 estados. Utilizando-se 201 isolados e 12 cultivares

diferenciadoras de feijoeiro, pode-se confirmar a presença das raças alfa, beta, epsilon, capa, lambda, além da descrição das novas raças eta, teta e mu.

A grande variedade de nomenclatura e a falta de padronização das cultivares diferenciadores dificultavam a estimativa do número de raças existentes e o desenvolvimento de programas de melhoramento. Em 1988, no Primer Taller de Anthracnose Del Fríjol em América Latina, CIAT, Cali/Colômbia foi sugerida a padronização universal das cultivares diferenciadores e uma metodologia padrão para a nomenclatura das raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*. Utilizando-se esse novo método, Rava et al. (1994) classificou 25 raças diferentes no Brasil, pertencentes aos antigos grupos alfa, delta, gama, Mexicano I, Mexicano II e Brasileiro I.

Em seis localidades do estado do Paraná foram identificadas as raças 7, 31, 65, 69, 73, 81, 87, 89 e 95, sendo que a última raça foi a mais virulenta e encontrada em cinco das localidades testadas (Thomazella et al., 2000).

Em Minas Gerais, 10 raças foram identificadas de um total de 48 isolados, sendo que as raças 65, 81 e 73 foram mais frequentes e ocorreram na maioria das regiões coletadas (Damasceno e Silva et al., 2007). Esses mesmos autores também detectaram a raça 337 ainda não descrita na literatura.

Devido à patogenicidade de diferentes isolados de *C. lindemuthianum* ser específica a determinadas cultivares de feijoeiro, admite-se sem prova genética direta que a interação entre o feijoeiro e esse fitopatógeno corresponde ao modelo gene a gene proposto por Flor (1971). Genes de resistência, tais como Co1 à Co8, já foram geneticamente identificados no feijoeiro comum (Geffroy, 1999).

5. Variabilidade genotípica em *Colletotrichum lindemuthianum* e suas relações filogenéticas

Técnicas como eletroforese em campo pulsado, citometria de fluxo e perfil telomérico avaliado por hibridização, foram utilizadas na observação da variação e organização do cariótipo molecular de *C. lindemuthianum* (O'Sullivan et al., 1998; Fierro et al., 1999). O tamanho do genoma dessa espécie é altamente variável e quando foram considerados os dados de citometria de fluxo, variações de até 59% foram encontradas. O número de cromossomos estimado variou de 9 a 12 dentre os isolados testados. A análise do genoma por eletroforese em campo pulsado mostrou

que os cromossomos dessa espécie podem ser divididos em duas classes de tamanhos distintos: um grupo de cromossomos maiores que 7 Mb e outro grupo formado por um número variável de pequenos cromossomos menores que 2,5 Mb (O'Sullivan et al., 1998). Parte dessa variabilidade da organização do genoma pode ser explicada pela presença ou ausência, em uma dada linhagem, de regiões genômicas dispensáveis e/ou de cromossomos inteiros (O'Sullivan et al., 1998). Diferentes seqüências presentes no genoma de fungos podem promover reorganizações. Elementos transponíveis podem atuar como substrato para recombinação ectópica, uma vez que são encontrados dispersos em várias cópias no genoma. Translocações, duplicações, inversões e deleções são alguns dos efeitos da presença e transposição desses elementos no genoma de diferentes fungos (Fierro et al., 1999).

A classificação clássica de fungos baseia-se em características morfológicas e culturais, como a assimilação de compostos ou produção de metabólitos secundários. A especificidade de hospedeiro é outra característica muito utilizada e importante para a diferenciação dos fungos fitopatogênicos, principalmente em espécies de *Colletotrichum* (Freeman et al., 1998). Com o advento da biologia molecular, diversas ferramentas têm sido utilizadas para auxiliar na classificação e na filogenia de fungos.

A sistemática dentro do gênero *Colletotrichum* é muito controversa, o que é refletido no número de espécies que pode variar de 29 a 700, dependendo do autor considerado (Freeman et al., 1993; Sutton, 1980, 1992).

Sherriff et al. (1994) avaliaram diferentes características morfológicas e as seqüências de DNA ribossomal de diversos isolados pertencentes a diferentes espécies do gênero *Colletotrichum*, agrupando-os em três classes. É sugerido que as espécies *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* e *C. trifolli* sejam classificadas dentro de uma mesma espécie por apresentarem alta identidade na seqüência de rDNA e características morfológicas distintas das demais espécies consideradas no trabalho.

Observa-se uma grande quantidade de raças fisiológicas de isolados de *C. lindemuthianum* originados de diferentes continentes (Fabre et al., 1995; Sicard et al., 1997) e mesmo dentro do estado de Minas Gerais-BR (Talamini et al., 2006; Damasceno e Silva et al., 2007). Esses resultados foram obtidos cruzando-se os dados da análise de marcadores moleculares com os de testes de patogenicidade em diferentes cultivares diferenciadoras de feijoeiro.

A relação filogenética do gênero *Colletotrichum* é outro tema de estudo controverso. Alguns autores consideram esse gênero pertencente à ordem Filacorales como grupo próximo aos Hipocreales quando utilizam as seqüências do rDNA para a construção de árvores filogenéticas (Jacobs et al., 2003; Goodwin, 2004). Contrariamente, Silva et al. (2003) propõem a retirada do gênero *Colletotrichum* da ordem Filacorales devido a grande distância filogenética com outros membros dessa ordem.

Relações filogenéticas entre diferentes grupos de fungos são propostas pela análise de seqüências de genes que codificam rDNA (Berbee et al., 2000), tubulinas (Begerow et al., 2004; Steenkamp et al., 2006) e a maior subunidade da RNA polimerase II-RBP1 (Tanabe et al., 2004), mas nem sempre o uso desses genes conseguem resolver determinadas relações filogenéticas (Berbee et al., 2000).

Uma forma eficiente para solucionar relações filogenéticas incertas ou difíceis de revolverem é o uso de seqüências de proteínas concatenadas codificadas pelo genoma mitocondrial. O uso dessa ferramenta tem gerado árvores filogenéticas robustas com alta confiabilidade no padrão de divergência dos diferentes grupos de fungos, inclusive em Chitridiomycetos e Zigomicetos (Forget et al., 2002; Bullerwell et al., 2003; Kouvelis et al., 2004; Pantou et al., 2006).

6. Genoma mitocondrial de fungos filamentosos

Mitocôndria é uma organela composta por dupla membrana plasmática e está presente no citoplasma das células da maioria dos organismos eucarióticos. A sua função primária é produzir ATP via fosforilação oxidativa graças à força protomotora gerada pelo acúmulo de prótons entre suas duas membranas. Não deve ser desconsiderado que importantes reações bioquímicas ocorrem na matriz mitocondrial, como as reações do ciclo do ácido cítrico (Lister et al., 2005).

Supõe-se que a mitocôndria das células eucarióticas seja derivada de uma bactéria ancestral endossimbiótica, pertencendo provavelmente ao grupo de alfa-Proterobactéria. Essa organela contém seu próprio material genético, remanescente do genoma do organismo endossimbiótico, capaz de codificar parte do seu proteoma (Kurland et al., 2000). Em fungos, assim como a maioria dos organismos eucarióticos, somente um conjunto de genes foram mantidos no genoma mitocondrial

durante a evolução (Gray et al., 1999). A maioria desses genes codificam para componentes hidrofóbicos da cadeia transportadora de elétrons, subunidades ribossomais e tRNA's. A maioria das proteínas mitocondriais é codificada por genes nucleares, traduzidas no citoplasma e importadas para a mitocôndria, requerendo um complexo protéico para o transporte e reconhecimento de proteínas (Neupert et al., 1997). Dois complexos protéicos, denominados TOM e TIM, presentes na membrana externa e interna, respectivamente, são necessários ao transporte de proteínas para a mitocôndria em *Neurospora crassa* (Endo et al., 2003; Mokranjac et al., 2005).

A maioria dos genomas mitocondriais descritos é composto de um único cromossomo circular. Algumas moléculas lineares foram descritas para protista ciliado (*Plasmodium*), alguns fungos e alga verde (*Chlamydomonas*), da mesma forma que genomas mitocondriais compostos por moléculas de DNA de diferentes tamanhos foram relatados em organismos como o chitridiomiceto *Spizellomyces punctatus* e o protista *Amoebidium parasiticum* (Burger et al., 2003). Diferentemente do genoma nuclear, o genoma mitocondrial está presente em alto número de cópias na mitocôndria, pois ele pode replicar mais de uma vez por ciclo celular (Barr et al., 2005).

Atualmente, diversas seqüências, completas ou parciais, do DNA mitocondrial de fungos estão disponíveis graças ao Projeto Genoma Mitocondrial de Fungos (FMGP). Esse projeto tem como objetivo principal o sequenciamento do DNA mitocondrial de diversos representantes dos fungos superiores e inferiores. Esses dados são utilizados na análise comparativa do conteúdo e organização do genoma mitocondrial, o controle da expressão dos mesmos, além da geração de árvores filogenéticas (Bullerwell et al., 2004).

Os genomas mitocondriais de fungos podem variar de 19,43 Kb em *S. pombe* (Bullerwell et al., 2003) a aproximadamente 100 Kb em *P. anserina* (Cummings et al., 1990). A grande variação no tamanho dos genomas mitocondriais pode ser explicada pela presença ou ausência de um grande número de íntrons nos genes presentes nesses genomas, redução do conteúdo de genes e variação do tamanho das seqüências intergênicas (Bullerwell et al., 2003).

Diversas outras características são compartilhadas entre os genomas mitocondriais de fungos, tais como: alto conteúdo A+T; utilização de códons preferências na tradução de suas proteínas; conservação de um conjunto mínimo de genes; presença de íntrons do grupo I e/ou do grupo II interrompendo genes

codificando proteínas; sintenia de determinados blocos de genes; presença de genes para RNA's transportadores e ribossômicos (Paquin et al., 1996; Forget et al., 2002; Woo et al., 2003; Bullerwell et al., 2003; Kouvelis et al., 2004; Pantou et al., 2006).

7. Genes de patogenicidade e virulência na interação planta-patógeno

Em geral, plantas são resistentes à maioria dos fitopatógenos existentes. Poucas interações planta-patógeno existem nas quais o hospedeiro é considerado suscetível, e o microrganismo, patogênico, estabelecendo-se assim um processo infeccioso (Ebel et al., 1997; Lebeda et al., 1999). Evidências indicam que na natureza a doença é a exceção, ao contrário do que possa esperar quando microrganismos e plantas se confrontam (Dangl et al., 1997). Estima-se que somente 10% de todas as espécies conhecidas de fungos cause doenças em plantas (Kahmann, 2001).

De acordo com o modelo proposto por Flor (1971), plantas capazes de abolir o processo de infecção possuem gene R (resistência), cujo produto interage com o produto do gene de avirulência Avr do patógeno. Esse modelo gene-a-gene na interação planta-patógeno foi proposto pela primeira vez entre a planta de linho e o fungo *Melampsora lini* (Flor, 1971).

O reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro é muito importante, pois permite que várias rotas de defesa sejam ativadas para conter o progresso da infecção. Acredita-se que a interação entre o gene R e o Avr desencadeia a expressão de uma série de genes ligados à resistência da planta contra o patógeno. Quando isso não ocorre, a planta não é capaz de ativar seus mecanismos de defesa de forma eficiente, resultando no estabelecimento da doença (Briggs et al. 1994; Wit, 1997, 1999).

Patogenicidade e virulência são termos utilizados por profissionais de diferentes áreas de forma confusa e muitas vezes imprecisa. Shaner et al. (1992) reúne algumas definições utilizadas por diversos autores sugerindo algumas recomendações na sua utilização. Neste trabalho, assim como Shaner et al. (1992) e Idnurm et al. (2001), será utilizado o termo patogenicidade como a capacidade de um patógeno causar doença num determinado hospedeiro. Dessa forma, a patogenicidade pode ser entendida como um caráter qualitativo. Os genes de patogenicidade não

devem ser essenciais para o patógeno completar seu ciclo de vida *in vitro* (Idnurm et al., 2001), mas necessários para a compatibilidade básica entre essas duas espécies resultando na colonização e incitação da doença num determinado hospedeiro.

Nas discussões da interação patógeno-hospedeiro é comum a utilização do termo virulência. Esse termo seria um componente importante da patogenicidade e, portanto, de caráter quantitativo (Sharner et al., 1992). Quando são utilizados patógenos mutantes nos hospedeiros e são observados sintomas reduzidos, é dito que a linhagem utilizada é menos virulenta, pois um gene de virulência foi afetado, mas esta linhagem continua patogênica. Essa distinção é possível quando se utiliza variáveis quantitativas, tais como quantidade e/ou tamanho das lesões, produção de esporos e dispersão.

Em relação ao seu modo de nutrição, os patógenos de plantas são tradicionalmente divididos em três grupos: biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. A distinção é feita determinando-se o modo pelo qual sua nutrição é derivada do seu hospedeiro. Por exemplo, necrotróficos são facilmente cultiváveis em laboratório, produzem abundantes enzimas hidrolíticas e toxinas, dificilmente estimulam a síntese de proteínas no hospedeiro, e causam necrose desde o início do processo de infecção nutrindo-se do tecido morto. Em contraste, biotróficos são freqüentemente difíceis de serem mantidos em cultura ou até mesmo não podem ser cultivados, produzem poucas enzimas degenerativas ou toxina que são importantes na patogenicidade, possuem estruturas que geram uma grande área de contato com a célula vegetal, estimulam a síntese protéica do hospedeiro, e assimilam nutrientes do tecido vivo (Gabriel, 1999). Entre esses dois extremos, temos os organismos hemibiotróficos que possuem inicialmente uma fase biotrófica, e logo em seguida o processo de colonização do hospedeiro é realizada de forma necrotrófica. *C. lindemuthianum* é um excelente modelo de um fitopatógeno hemibiotrófico (O'Connell, 1985; Latunde-Dada, 2001).

Desde o contato inicial entre o patógeno e o seu hospedeiro até os sintomas da doença existem diversos passos, como a deposição da unidade propagativa do patógeno, pré-penetração, penetração, estabelecimento das relações parasitárias estáveis e a colonização propriamente dita (Amorim, 1995). Em cada uma dessas etapas, o patógeno regula a expressão de genes essenciais, de patogenicidade ou de virulência, que vão possibilitar a supressão das respostas de defesa da planta, a sobreposição dos obstáculos para a colonização do tecido vegetal, a absorção dos

nutrientes necessários à sua sobrevivência e, ao mesmo tempo, a manutenção do seu hospedeiro vivo.

7.1. Genes envolvidos na adesão, germinação e penetração

A adesão do conídio à superfície da planta hospedeira, seguida pela germinação do conídio que resulta no crescimento de uma hifa de germinação na superfície do órgão a ser penetrado, são etapas essenciais que determinam substancialmente o processo de infecção. A sua adesão previne os esporos de serem retirados da superfície do tecido hospedeiro pela chuva ou pelo vento, além de permitir o contato necessário para a sinalização que desencadeia o processo de pré penetração. Em geral, admite-se que o processo de adesão ocorra de maneira passiva (o que significa que não necessita de síntese de proteínas ou de novos compostos) pela presença de matriz extracelular complexa preexistente e/ou de algum componente presente na parede celular do conídio.

Estudos de microscopia demonstram que esporos e tubos geminativos dos patógenos *Colletotrichum*, *Magnaporthe grisea*, *Blumeria graminis* e *Uromyces fabae* são envoltos por uma espessa camada mucilaginosa (Bailey et al., 1992; Howard et al., 1996; Mendgen et al., 1996; Carver et al., 1999). Em *M. grisea*, uma mucilagem pré-formada é secretada, independente da síntese de proteínas, permitindo esse fitopatógeno aderir à superfície da planta hospedeira (Howard et al., 1996). Uma adesão mais efetiva e secreção de mais material mucilaginoso ocorrem no decorrer da germinação. Essa segunda secreção de mucilagem é resultado da ativação do metabolismo e síntese protéica (revisado por Mendgen et al., 1996). Compostos responsáveis pela adesão dos conídios de *C. lindemuthianum* provavelmente são pré-formados, e estão presentes na superfície dos conídios quando esses são depositados sobre a superfície da planta. Os resultados obtidos com a utilização de técnicas de substituição por congelamento demonstraram que os conídios de *C. lindemuthianum* são cobertos por um material denso e fibrilar, arranjado perpendicular à parede celular, de aparência reticular, denominado de capa do conídio (O'Connell et al., 1996). Essa camada é muito similar às estruturas encontradas na forma leveduriforme do patógeno humano *Candida albicans* e supõe-se que esteja envolvida com a adesão dessa levedura (Perfect et al., 1999).

A composição da matriz extracelular dos conídios é bastante heterogênea e complexa, e possivelmente sofre influência de fatores abióticos. Os principais constituintes dessa mucilagem são polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas. Uma glicoproteína de 110 KD, identificada na parede do conídio de *C. lindemuthianum*, possivelmente está envolvida na adesão inicial de esporos em superfícies hidrofóbicas, como a camada de cutina do tecido foliar do hospedeiro (Hughes et al., 1999). A aplicação de anticorpos monoclonais contra essa glicoproteína interferiu com a adesão do esporo em placas de Petri de poliestireno, e a própria glicoproteína ligou-se à microesferas do mesmo material.

Interações hidrofóbicas também são importantes na aderência de esporos de fitopatógenos. Conídio de *M. grisea* e de certas espécies de *Colletotrichum* e de *Uromyces* são capazes de aderirem às superfícies hidrofóbicas de materiais inertes como teflon e polietileno. Essa característica leva a suposição de que interações hidrofóbicas sejam importantes na adesão dos esporos desses fitopatógenos na superfície hidrofóbica do tecido hospedeiro (Tucker et al., 2001).

Uma classe de proteína, abundantes na parede celular de fungos, chamada hidrofobina têm um papel importante na adesão por formar uma camada anfipática entre a parede celular do fungo, constituída de polissacarídeos, e a camada de cutícula hidrofóbica do tecido vegetal. Mutantes de *M. grisea* contendo o gene codificador para hidrofobina (*MPGI*) inativado mostra forte redução na habilidade de diferenciar apressórios e são menos virulentos em folhas de arroz (Talbot et al., 1996).

Interessantemente, atividades enzimáticas foram detectadas na mucilagem que envolve conídios de determinados fungos fitopatogênicos. Diversas enzimas foram detectadas na mucilagem dos conídios de *C. graminicola* (Epstein et al., 1997), inclusive uma esterase (Pascholati et al., 1993). Segundo Pascholati e colaboradores (1993), a presença de esterases e cutinases na mucilagem desse fungo possivelmente está mais relacionada com a degradação da cutícula, para auxiliar a penetração do fitopatógeno no tecido hospedeiro, do que com o processo de adesão dos conídios.

A germinação dos conídios ocorre após sua adesão na superfície da planta. O início desse processo pode ser estimulado por diferentes fatores físicos e/ou químicos e varia de espécie para espécie. Sabe-se que ceras presentes na epiderme do tecido hospedeiro e etileno produzido pelo abacate são capazes de induzir a germinação e

diferenciação do apressório em *Colletotrichum gloeosporioides* (Flaishman et al., 1994, 1995).

Além de fatores químicos, características físicas do ambiente são percebidas pelos fungos e atuam como um sinal no controle da expressão de genes. O simples contato com a superfície rígida da planta pode ser um sinal para a mudança na expressão de genes. Os genes *chip* de *C. gloeosporioides* são expressos nos conídios quando estes estão em contato com superfícies rígidas (Liu et al., 1998; Kim et al., 2000). O gene *chip1* é capaz de complementar um mutante de levedura deficiente em proteólise, sugerindo o papel da degradação de proteínas durante a germinação de conídios (Liu et al., 1998).

O fitopatógeno precisa penetrar no tecido hospedeiro para obter seus nutrientes. Assim, dois modos de penetração são possíveis. A penetração pode ocorrer de forma direta, na qual o fungo fitopatogênico penetra o tecido hospedeiro por meio de aberturas naturais como estômatos e/ou ferimentos. No segundo caso, a penetração ocorre de forma indireta, sendo necessário o fitopatógeno atravessar a camada de cutícula e a parede celular da célula epidermal do tecido hospedeiro.

Para a penetração indireta, o fungo fitopatogênico tem três alternativas para a penetração do tecido vegetal: crescimento apical do tubo germinativo e/ou de hifas, secreção de enzimas hidrolíticas da parede celular (força enzimática) e pressão mecânica (Bechinger et al., 1999).

Certos fungos fitopatogênicos penetram o tecido vegetal por meio de ferimentos, aberturas naturais ou diretamente sem modificação evidente das hifas ou do tubo germinativo. *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* são capazes de penetrar o tecido de raízes dos seus hospedeiros sem que ocorram mudanças na morfologia da hifa de penetração (Mendgen et al., 1996).

Outros fungos formam estruturas na ponta dos tubos germinativos ou de hifas, normalmente chamadas de apressórios, a partir dos quais diferenciam hifas especializadas na penetração do tecido hospedeiro. Apressórios típicos podem ser visualizados no processo de infecção dos fungos *M. grisea* e *C. lindemuthianum*.

O tubo germinativo de *C. lindemuthianum* diferencia um apressório que se prende firmemente à epiderme do hospedeiro (O'Connell et al., 1985). A adesão dessa estrutura na superfície da planta é essencial para o sucesso da penetração da cutícula e da parede celular. Essa adesão permite que o patógeno permaneça em contato com o hospedeiro em tempo suficiente para que a penetração ocorra,

localizando a hifa de infecção no sítio específico para que a invasão química e/ou física aconteça. Obviamente, caso a penetração necessite de força física, a aderência firme é essencial para que o apressório possa exercer a força mecânica requerida para a penetração sem deslocar o fungo da superfície a ser penetrada (Bailey et al., 1992). A sua formação é freqüentemente acompanhada pela secreção de uma matriz mucilaginosa que o envolve. Em *C. lindemuthianum* essa matriz estende-se para as regiões de cutícula próximas ao apressório, e parece colaborar para a sua adesão (O'Connell et al., 1985; Bailey et al., 1992). Interessantemente, essa mucilagem está ausente na região da parede do apressório que fica firmemente aderida à cutícula.

Os resultados obtidos a partir do uso de lecitinas e anticorpos revelaram que as matrizes extracelulares do tubo germinativo e apressório são muito similares na composição, mas diferem daquelas secretadas no conídio e hifa de *C. lindemuthianum* (O'Connell et al., 1996). Diferenças claras existem entre as glicoproteínas da parede celular do apressório comparadas as do micélio desse patógeno (Hutchison et al., 2000). Esses resultados demonstram claramente a expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento do processo de infecção dos fitopatógenos.

Tetraspaninas são proteínas envolvidas em complexos na membrana plasmática que controlam adesão, diferenciação e mobilidade. Foi detectada apenas uma cópia de um gene que codifica tetraspaninas, *pls1*, no genoma de *M. grisea* e foi observado que a proteína PLS1 é essencial para a penetração mediada pelo apressório nas folhas de seu hospedeiro, possivelmente por ser capaz de reorganizar o citoesqueleto de actina durante a formação do peg de penetração (Clergeot et al., 2001). Mutantes de *C. lindemuthianum*, contendo o gene de tetraspanina interrompido, não são capazes de penetrar o tecido vegetal, e, portanto, não são considerados patogênicos (Veneault-Fourrey et al., 2005). Essas linhagens, assim como em *M. grisea*, não são capazes de diferenciar o peg de penetração a partir do qual se desenvolve a hifa de penetração. Um segundo gene em *M. grisea* é necessário para a formação do peg de penetração. Esse gene denominado de *MST2* é ortólogo ao fator de transcrição *STE2* das leveduras (Park et al., 2004).

Outros genes desempenham diferentes funções na diferenciação e/ou funcionalidade do apressório em fungos fitopatogênicos. Genes relacionados com a modificação da composição da membrana plasmática durante a formação do apressório foram identificados, tais como um putativo gene codificador de uma

ATPase tipo-P *PDE1* em *M. grisea* (Balhadere et al., 2001) e o gene *CHIP6* de *C. gloeosporioides*, codificando glicosilesterol transferase (Kim et al., 2002). Em *M. grisea*, a funcionalidade do apressório é controlada por uma proteína cinase dependente de AMPc *CpkA* a uma MAP cinase (MPS1) (Xu et al., 1997, 1998), assim como o gene *MgFus3* que codifica uma MAP cinase em *Mycosphaerella graminicola* (Cousin et al., 2006).

Dufresne et al. (1998) obtiveram um mutante de *C. lindemuthianum* com sua habilidade de penetrar a camada de cutícula alterada, possivelmente pelo desenvolvimento de um apressório não funcional. Essa linhagem, quando inoculado no feijoeiro, apresentou diminuição da virulência resultando em poucas lesões. O gene clonado, *clk1*, responsável pelo fenótipo codifica para um cinase cuja expressão é constitutiva, sendo o primeiro gene isolado desse patógeno envolvido com o processo de infecção.

Outros genes são expressos exclusivamente no apressório e possivelmente a função dos mesmos seja importante no processo de infecção. Em *C. gloeosporioides*, o gene *cap2* é expresso unicamente no apressório, e mutantes incapazes de expressarem CAP2 mostraram um decréscimo drástico na virulência quando inoculados em abacate (Hwang et al., 1995).

A melanização dos apressórios é necessária para a função dos mesmos na penetração do tecido vegetal. Melaninas são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos; apresentam colorações marrom ou preta, podendo adquirir outras tonalidades; possuem caráter hidrofóbico e são carregadas negativamente (Langfelder et al., 2003).

A ultraestrutura de apressórios de diferentes espécies de *Colletotrichum* demonstra algumas características em comum. Normalmente, a parede do apressório possui uma ou três camadas, com melanina preferencialmente depositada dentro de uma delas (Bailey, 1992). A deposição de melanina no apressório diminui a permeabilidade e, desta forma, o fungo pode aumentar a pressão de turgor interna produzindo grandes quantidades de glicerol (De Jong et al., 1997). Patógenos que possuem apressórios melanizados demonstram redução da virulência, até perda da patogenicidade, quando a síntese dessa substância é interrompida. Genes envolvidos com a melanização do apressório são fundamentais para a patogênese nos fungos *Colletotrichum lagenarium*, *C. lindemuthianum* e *M. grisea* (Kubo et al., 1991; Thompson et al., 2000; Parisot et al., 2002).

Mutantes para o gene *clap1* em *C. lindemuthianum* são incapazes de induzirem sintomas de antracnose em feijoeiros. Esses mutantes desenvolvem um micélio claro e com uma redução na formação de apressório *in vitro*. Essas estruturas são morfológicamente diferentes dos apressórios da linhagem selvagem, além de não possuírem deposição de melanina. Constatou-se que esse gene codifica uma enzima transportadora de cobre, essencial para atividade da fenol oxidase responsável pela biosíntese de melanina (Parisot et al., 2002).

O sucesso da penetração do fitopatógeno não depende apenas da diferenciação e da funcionalidade de estruturas como o apressório. A capacidade de produção e secreção de enzimas hidrolíticas da camada de cutina e da parede celular das células vegetais é importante na penetração indireta. A cutina é a primeira camada a ser penetrada por um fitopatógeno incapaz de penetrar de forma direta. O papel das cutinases na penetração das células vegetais é controverso (Schäfer, 1993). A interrupção do gene codificador para cutinase Pbc1 de *Pyrenopeziza brassicae* resulta em um mutante não patogênico incapaz de penetrar o tecido hospedeiro (Li et al., 2003). Em *Nectria haematococca*, o gene de cutinase é um fator de virulência, pois as linhagens mutantes para esse gene são menos virulentas do que a linhagem selvagem (Rogers et al., 2000). O mesmo resultado foi obtido em linhagens mutantes de *F. solani* f. sp. *pisi* deficientes na síntese de cutinase (Rogers et al., 1994). Comménil et al (1998) sugeriram que uma lipase capaz de hidrolisar cutina era requerida para a penetração de *Botrytis cinerea* no tecido da planta hospedeira. A obtenção de uma linhagem mutante para o gene dessa lipase *lip1* e de uma cutinase *cutA* demonstrou que as atividades dessas enzimas não são requeridas para a patogenicidade nem para a virulência desse fitopatógeno (Reis et al., 2005).

7.2 Genes envolvidos no crescimento biotrófico e necrotrófico

Os fungos biotróficos caracterizam pela capacidade de absorção de nutrientes do seu hospedeiro sem que suas células sejam mortas. O controle da interação patógeno-hospedeiro é realizado por trocas de sinais químicos entre esses parceiros que resultará na ativação ou repressão de determinados genes. A manutenção dessa relação necessita de um fino controle genético dos dois parceiros, principalmente do patógeno que suprime as respostas de defesa, ao mesmo tempo em que mantém a célula vegetal viável para suprir suas necessidades nutricionais.

A hifa ou haustório de fungos biotróficos são envolvidos numa matriz extracelular quando penetram a parede celular vegetal e entram em contato íntimo com a membrana plasmática da célula hospedeira. A vesícula de infecção, assim com a hifa primária de *C. lindemuthianum* possuem uma matriz extracelular amorfa, parcialmente composta de polissacarídeos e glicoproteínas (O'Connell et al., 1986; 1987). Essa matriz correlaciona-se com o crescimento biotrófico desse fungo, pois essa camada não foi observada no crescimento das hifas secundárias típicas da fase necrotrófica dessa espécie (O'Connell et al., 1985).

Uma glicoproteína presente nessa matriz foi identificada, e o seu gene isolado – *CHI1* (Pain et al., 1994; Perfect et al., 1998). Homólogos desse gene estão presentes em outras espécies do gênero *Colletotrichum* e são expressos somente na fase biotrófica desses fungos (Perfect et al., 2000). Apesar de *CHI1* ser de origem fúngica, a proteína predita assemelha-se com polipeptídios da parede celular de plantas. Supõe-se que *CHI1* seja uma glicoproteína estrutural, substituindo ou mimetizando glicoproteínas da parede celular vegetal, que contribua para a manutenção da fase biotrófica (Perfect et al., 2000).

Durante a passagem do modo de nutrição biotrófico para o necrotrófico, ocorrem grandes modificações no padrão de crescimento do fungo e nos genes expressos pelo patógeno. Essa transição é pouco entendida por que existem raros trabalhos focados especificamente no seu controle.

Em *C. lindemuthianum*, foram identificados dois mutantes envolvidos na transição da fase biotrófica para a necrotrofica. O primeiro mutante desenvolve todas as estruturas de infecção até a fase da hifa primária, sendo incapaz de diferenciar hifas secundárias típicas da fase necrotrófica. Dessa forma, os sintomas típicos da antracnose não podem ser observados. A reação é semelhante ao que ocorre quando uma cultivar resistente é inoculada com a linhagem selvagem. O gene identificado, *CLTA1*, mostra alta homologia com um grupo de ativadores transcricionais de fungos. Provavelmente esse fator de transcrição controla a expressão de genes que permitem o crescimento necrotrófico no tecido hospedeiro (Dufresne et al., 2000).

O segundo mutante, também não patogênico, diferencia algumas hifas secundárias, mas não ocorre a fase necrotrófica. O gene envolvido nesse fenótipo é um regulador geral da assimilação de nitrogênio (*clnr1*), sendo o mutante incapaz de usar uma variedade de fontes de nitrogênio (Pellier et al., 2003). Essa proteína demonstra alta similaridade com reguladores gerais AREA e NIT2, envolvidos com

o metabolismo do nitrogênio. Durante o crescimento na planta, o fungo tem que se adaptar às condições nutricionais, inclusive com situações de escassez de nutrientes. Genes que são expressos em condições limitantes de carbono e/ou nitrogênio também são ativados durante a patogenicidade possuindo um papel crucial na manutenção da infecção.

O crescimento dos patógenos no interior do tecido hospedeiro necessita da ação de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular das células vegetais. A fase necrotrófica é marcada pela degradação maciça do tecido vegetal provocada principalmente pelo aumento na secreção de tais enzimas.

Até o presente momento foram isolados dois genes, *clpg1* e *clpg2*, em *C. lindemuthianum* que codificam para endopoligalacturonases (endoPGs) (Centis et al., 1996; 1997). Apesar da mesma função, esses são expressos diferencialmente. *clpg1* contribui em maior parte para a atividade de endoPGS, tanto em cultura axênica quanto na fase necrotrófica; enquanto *clpg2* é transcrito transitória e rapidamente *in vitro* e sob presença de pectina, mas não durante a fase necrotrófica (Centis et al., 1997). Utilizando-se o gene repórter *gfp* sob controle do promotor do *clpg2*, observou-se que o gene que codifica endoPG (*clpg2*) é expresso nos estágios iniciais da germinação do conídio e durante a formação do apressório, tanto *in vitro*, em meio contendo pectina, quanto na planta hospedeira (Dumas et al., 1999). Atividade de endoPGs no meio de cultura deve-se principalmente a atividade de CLPG1, já que CLPG2 não é secretada para o meio extracelular. CLPG2 não acumula no meio de cultura, mas é depositada na parede celular do fungo durante seu crescimento em pectina e durante a formação do apressório, indicando que essa isoenzima auxilia a fase de penetração de *C. lindemuthianum* (Herbert et al, 2004).

Foram identificadas seqüências no promotor de *clpg2* homólogos a *cis* elementos de respostas à filamentação e invasão de leveduras. Esses resultados levaram à proposição de que o controle dos genes de virulência em fungos filamentosos envolve a formação de complexos de ativadores de transcrição similares aqueles encontrados no crescimento invasivo de leveduras (Herbert et al., 2002).

Na fase biotrófica, e principalmente na necrotrófica, a secreção de diferentes proteínas, tais como enzima hidrolíticas dos componentes da membrana celular vegetal, lípases e proteases têm um papel essencial na patogênese. Um dos genes que controlam o tráfego de vesículas em *C. lindemuthianum* foi isolado, e o seu papel na

patogenicidade confirmado pela obtenção de mutantes nulos (Dumas et al., 2001; Siriputthaiwan et al., 2005)

8. Influência do pH ambiental na patogênese

Os microrganismos que vivem em ambientes aquosos são influenciados diretamente pelo pH externo. Além de atuar sobre a superfície celular, o pH influencia nas atividades de enzimas extracelulares que são importantes para a sobrevivência desses organismos.

A adaptação ao pH externo é importante para que o organismo consiga colonizar diferentes habitats, como *Aspergillus nidulans* que é capaz de crescer sob a variação de pH 2,5 a 9,0. A sobrevivência em diferentes valores de pH ocorre devido a expressão diferencial de genes e/ou secreção de metabólitos modificadores do pH externo. Logo, a célula possui mecanismos de percepção do pH externo e controla os genes necessários para essa adaptação.

Tilburn et al. (1995) isolaram o gene *pacC* cujo produto resulta numa proteína de 678 aminoácidos (aa) que capacita *A. nidulans* a adaptar-se à diferentes valores de pH. Essa proteína, dominada de PacC, é um fator de transcrição caracterizado pela presença de três motivos denominados Dedos de Zinco do tipo Cys₂His₂. Esse domínio reconhece a sequência consenso 5'GCCARG3' presente nos promotores de genes sobre os quais esse fator de transcrição atua. O dedo de zinco 1 está mais relacionado com a estabilização do dedo 2, do que com a ligação propriamente ao DNA. Contrariamente, os dedos de zinco 2 e 3 atuam de forma ativa na interação com as regiões 5' e 3' do DNA, respectivamente, na sequência consenso na qual PacC liga-se (Fernandez-Martinez et al., 2003).

Genes ortólogos foram isolados em diferentes fungos, como nos ascomicetos filamentosos *A. niger* (MacCabe et al., 1996), *F. oxysporum* (Caracuel et al., 2003), *S. sclerotiorum* (Rollins et al., 2001), *Fusarium verticillioides* (Flaherty et al., 2003) e nos basidiomicetos *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal et al., 2005), *Crinipellis pernicioso* (Silva. G. F., comunicação pessoal). Os genes ortólogos presentes em leveduras, como *Y. lipolytica* (Lambert et al., 1997) e *C. albicans* (Ramon et al., 1999), recebem a denominação *RIM101*. A região de dedo de zinco presente na sequência N-terminal de proteínas da família PacC/Rim101 é altamente conservada

entre os diferentes organismos. Outras regiões presentes na seqüência de aminoácidos de PacC/Rim101 podem ser conservadas entre proteínas de organismos filogeneticamente mais próximos.

A proteína PacC de *A. nidulans* é traduzida na sua forma inativa, denominada PacC⁷², e ativada por um processamento pós traducional por duas clivagens proteolíticas que ocorrem somente em pH alcalino. PacC⁷² em pH ácido está em uma conformação chamada fechada. Nessa conformação, três regiões chamadas A, B e C interagem entre si tornando indisponível uma seqüência de aminoácidos que é reconhecida pela protease PalB. Quando o pH ambiental muda para valores alcalinos, PacC⁷² muda de conformação graças a uma cascata de sinalização, ocasionando a sua clivagem proteolítica, que resulta na proteína Pac⁵³ inativa. Essa forma de PacC sofre um segundo processamento proteolítico independente do pH ambiental, que por sua vez resulta na forma ativa PacC²⁷ que contém cerca de 250 resíduos de aminoácidos da região N-terminal, na qual estão presentes os três dedos de zinco (Arst et al., 2003).

Tanto PacC⁵³ quanto PacC²⁷ são encontrados no núcleo da célula, mas somente a forma PacC²⁷ é funcional. A região do terceiro dedo de zinco de PacC se sobrepõe à um Sinal de Localização Nuclear necessário a sua translocação do citoplasma em direção ao núcleo (Fernández-Martínez et al., 2003). PacC⁵³ possui ainda um segundo Sinal de Localização Nuclear Bipartido na região A dessa proteína, que é possivelmente funcional (Fernández-Martínez et al., 2003).

A proteína PacC está envolvida diretamente com a ativação e repressão de genes cuja transcrição depende do pH ambiental. Esta proteína age como ativadora ou repressora da transcrição de genes, e, como visto anteriormente, a sua forma ativa está presente apenas em condições ambientais alcalinas. A passagem de sua forma inativa, presente em ambientes ácidos, para a forma ativada depende de um grupo de proteínas responsáveis por uma via de transdução de sinal capaz de perceber as variações de pH externo e transmitir esse sinal até a ativação de PacC. Em *A. nidulans*, esse sistema é composto pelos genes *pala*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *palI*. A via de regulação de genes pelo pH externo é, provavelmente, conservada e ortólogos a esses genes já foram descritos em diferentes organismos (Peñalva et al., 2002).

De todas as proteínas da via de sinalização, a função de PalC ainda não foi determinada, apesar de seu papel na transdução do sinal ser essencial. PalH, possivelmente auxiliado por PalI, é capaz de perceber a variação do pH ambiental.

Ambas as proteínas possuem vários domínios transmembranas e estão em contato tanto com o ambiente extracelular quanto com o citoplasma (Negrete-Urtasun et al., 1999; Herranz et al., 2005). PalF é uma proteína da família das arrestinas, contendo dois desses domínios, que interagem com a região C-terminal de PalH (Herranz et al., 2005). Em pH alcalino, a interação de PalH com PalF é favorecida, acarretando a sua fosforilação e ubiquitinação independente de PalA, PalB e PalC. PalA possui motivos relacionados com a interação proteína-proteína. Um desses motivos é o consenso PXXP que pode reconhecer e ligar-se a proteínas que possuam o domínio SH3 (Negret-Urtasun et al., 1999). PalA também é capaz de ligar-se ao motivo YPX(L/I) (Vincent et al., 2003). Interessantemente, PacC⁷² possui dois motivos YPX(L/I) que ladeiam o sítio de sinalização da protease requerido para a primeira clivagem dependente de pH. A interação de PalA e PacC⁷², dependente de pH, é necessária para a atuação da protease PalB para a geração da forma PacC⁵³, e para o processamento dessa forma para a forma ativa PacC²⁷.

Mutantes contendo a perda de função em algum dos seis genes PalA ou em PacC mimetizam um crescimento em meio com pH ácido. Essas linhagens quando são cultivadas em pH alcalino, ocorre a diminuição da expressão de genes que no tipo selvagem seriam ativados em ambiente alcalino (chamados genes alcalinos), e aumentam a expressão de genes que no tipo selvagem sofreriam inibição da transcrição (chamados genes ácidos) (Arst Jr. et al., 2003).

Mutações que levem a ativação de PacC independente do pH (*pacC^C*) resultam no fenótipo que mimetiza crescimento em meio com pH alcalino, contrário aquele que mimetiza crescimento em acidez. Mutações nos genes *pal* não resultam nesse último tipo de fenótipo. O terceiro tipo de mutação resulta em linhagens que mimetizam o crescimento em ambientes de pH neutro (*pacC^{C,-}*), que resultam na expressão tanto de genes ácidos quanto de genes alcalinos (Arst Jr. et al., 2003).

Metarhizium anisopliae é um fungo patógeno de insetos. Sua infecção é acompanhada da secreção de enzimas que atuam como fatores de virulência, como quitinases e proteases. A expressão dessas enzimas responde ao pH externo. Leger et al. (1998) demonstraram que a alcalinidade da cutícula infectada representa o sinal que culmina na síntese e secreção desses fatores de virulência.

Botrytis cinerea é um dos poucos fungos que exibem baixa especificidade de hospedeiro atacando mais de 200 espécies de plantas. A infecção causada por esse patógeno é acompanhada da expressão de diversas enzimas hidrolíticas que

degradam os constituintes da parede celular vegetal e das defesas químicas da planta. A produção de fatores de patogenicidade (polissacarídeos extracelulares, ácido oxálico, protease ácida, poligalacturonase e lacase) nesse organismo é regulada pelo pH ambiental, sendo máxima nos valores de pH 3,1 e 6,0, que são próximos aos valores de pH de frutos e folhas de diferentes hospedeiros, respectivamente (Manteau et al., 2003).

Em diferentes espécies de *Colletotrichum*, a produção de amônia é considerada como um fator de virulência. Esse íon no ambiente externo acarreta o aumento do pH para valores próximos àqueles no qual a atividade de pectato liase é máxima. Essa enzima é importante na patogenicidade desse gênero (Prusky et al., 2001).

O gene *pelB* de *C. gloeosporioides* codifica uma pectato liase considerada fator de virulência durante a colonização de frutos de abacate. A sua expressão não foi detectada em pH 4,0; mas a sua transcrição e secreção aumentaram com a alcalinização do pH externo, atingindo valores máximos em pH 6,0. Nove prováveis sítios de ligação do fator de transcrição PacC de *A. nidulus* foram encontrados na região promotora de *pelB* (Drori et al., 2003). Nesse mesmo patógeno, foi isolado o gene *pac1* ortólogo ao *pacC*. Sua transcrição é influenciada pelo pH ambiental, seguindo o mesmo padrão demonstrado pelo gene da pectato liase (Drori et al., 2003).

O isolamento do gene *pacC* de *F. oxysporium* permitiu verificar que o seu padrão de transcrição é semelhante ao seu ortólogo *pacC* de *A. nidulans*, sendo preferencialmente transcrito em ambientes mais alcalinos (Caracuel et al., 2003^a). O mutante com perda de função cresce pobremente em meios de cultura com pH alcalino, apresenta a atividade aumentada de protease ácida e da transcrição de genes de poligalactorunase transcritas preferencialmente em pH ácido. Esse mutante foi mais virulento do que a linhagem selvagem quando raízes de tomateiros foram inoculadas com o mesmo. Sendo assim, PacC de *F. oxysporium* atua como um regulador negativo de genes de virulência, possivelmente prevenindo a transcrição de genes expressos em ambientes ácidos, que são importantes para sua virulência. PacC também é capaz de controlar o estresse osmótico permitindo que *F. oxysporium* seja capaz de suportar ambientes contendo alta concentração de Li⁺ e Na⁺ graças à ativação do gene *enal*(Na⁺-ATPase tipo P) (Caracuel et al., 2003^b).

Em *S. sclerotiorum*, ácido oxálico e poligalacturonases são considerados fatores de virulência durante sua infecção no hospedeiro. A produção e secreção desses fatores sofrem influência do pH externo, assim como a transcrição do seu gene ortólogo ao gene *pacC* de *A. nidulans* denominado *pac1* (Rollins et al., 2001). O gene *pac1* é importante para a regulação apropriada de processos fisiológicos importantes para a virulência e desenvolvimento em *S. sclerotiorum* (Rollins, 2003). A obtenção de um mutante nulo para o gene *pac1* demonstrou a sua importância para o crescimento vegetativo de *S. sclerotiorum* em ambientes alcalinos. O crescimento do mutante foi progressivamente inibido com o aumento do pH ambiental, chegando à inibição completa em pH 6,2. O gene *pg1* capaz de codificar uma endopoligalacturonase, preferencialmente transcrito em pH mais ácido, é transcrito nesse mutante em valores de pH nos quais sua transcrição é reprimida na linhagem selvagem. Esse resultado demonstra que Pac1 é capaz de inibir a transcrição de *pg1* em *S. sclerotiorum* quando esse fitopatógeno está crescendo em ambientes com valores de pH próximos da neutralidade. A síntese de ácido oxálico, considerado um fator de virulência desse patógeno, foi drasticamente reduzida nesse mutante, da mesma forma que o desenvolvimento e maturação dos esclerócios em cultura foram afetados. Quando os mutantes com perda de função no gene *pac1* foram inoculados em tomateiro e *Arabidopsis*, observou-se uma redução drástica da virulência, indicando que *pac1* é um determinante de virulência para esse patógeno.

PacC em *A. nidulans* regula positivamente a expressão de fatores de virulência necessários a infecção desse patógeno no tecido pulmonar (Bignell et al., 2005). Mutantes com perda da função dos genes *pacC* ou *palB* demonstraram ser menos virulentos nos testes de patogenicidade, levando à conclusão que a via de sinalização de em resposta ao pH é necessária para a aspergilose pulmonar invasiva. Linhagens contendo PacC na sua forma processada, mutante apresentando ganho de função, são mais virulentas em relação à linhagem selvagem, corroborando com a hipótese de que PacC tem um papel crucial em infecções causadas por *A. nidulans*.

Candida albicans, uma das leveduras patogênica de humanos mais frequentemente encontrada, é um fungo dimórfico cuja transição do crescimento unicelular para o micelial é crítica para a sua patogênese (De Bernardis et al., 1998). Pelo menos *in vitro*, fatores como pH e temperatura controlam a transição dimórfica. Foi demonstrado que CaRim1 tem um papel crucial na virulência. Mutantes com perda de função demonstraram redução da virulência e linhagens contendo CaRim1

processada na sua forma ativa independente do pH foram mais virulentas (Davis et al., 2000).

O gene *RIM101*, ortólogo ao gene *pacC*, foi isolado no basidiomiceto *U. maydis* (Aréchiga-Carvajal et al., 2005). Mutantes nulos para o gene *RIM101* apresentaram a transição dimórfica *in vitro* que normalmente é induzida por pH, e não diferiram da linhagem selvagem em relação à taxa de crescimento, resistência a estresse osmótico causado por altas concentrações de sorbitol e KCl, e patogenicidade. Assim como relatado para outras espécies de fungos, esse mutante apresenta alteração na secreção de proteases e aumento na sensibilidade à Na^+ e Li^+ .

Esses resultados indicam que o papel do fator de transcrição PacC/Rim101 na virulência de fungos e leveduras patogênicas depende da espécie avaliada. De acordo com a influência de PacC/Rim101 na virulência de organismos patogênicos, os fungos podem ser divididos em três grupos: O primeiro grupo reúne os fungos nos quais genes de virulência não estão sobre o controle do fator de transcrição PacC/Rim101, com é o caso de *U. maydis*. O segundo grupo reúne organismos cujos fatores de virulência são ativados pelo fator de transcrição PacC/Rim101, como *A. nidulans*, *S. sclerotiorum* e *C. albicans*. E o terceiro grupo é formado por espécies nas quais PacC/Rim101 atuaria como um repressor de genes de virulência, como observado em *F. oxysporum*.

O pH ambiental parece ser um fator importante na virulência dos organismos do segundo grupo, correlacionando-se melhor com o papel de PacC na virulência dos mesmos. A secreção de diversas enzimas como lipase, celulase, amilase, pectinase e proteases por diversos isolados fitopatogênicos e endofíticos de *Colletotrichum* foi afetada pelo pH do ambiente (Maccheroni et al., 2004). Todas essas enzimas estão relacionadas com a hidrólise de componentes da parede celular vegetal e podem contribuir para a virulência nesse gênero. O isolamento do gene *pacC* e a obtenção de mutantes nulos poderão esclarecer a relação do pH ambiental na secreção dessas enzimas, inclusive o papel das mesmas na patogênese e/ou virulência.

9. Isolamento de genes de patogenicidade via mutagênese

Os estudos baseados em análises genéticas permitiram a identificação de um grande número de genes relacionados com a patogenicidade e/ou virulência de

patógenos. Dois fatores contribuíram para esse sucesso. Primeiramente, a maioria dos estudos foi realizada *in vitro* graças aos métodos de mutagênese disponíveis na literatura. E segundo, os métodos de seleção de mutantes deficientes na patogenicidade e/ou virulência muitas vezes são rápidos, precisos e viáveis para análise um grande número de mutantes.

Para a aplicação eficiente da técnica de mutagênese visando ao isolamento de genes é necessária a obtenção de mutantes com um fenótipo facilmente detectável, por exemplo, não patogênico, para subsequente isolamento do gene cuja inativação é responsável pelo fenótipo. A grande vantagem dessa técnica é o isolamento de genes cuja função e seqüência não são conhecidas *a priori*. As mutações etiquetadas pela integração de plasmídeos permitem isolar o gene mutado pelo procedimento de recuperação do vetor. Os genes *FRP1*, *APH1* e *MgFus3* foram isolados por essa técnica nos fitopatógenos *F. oxysporum* (Duyvesteijn et al., 2005), *C. lagenarium* (Takano et al., 2006) e *Mycosphaerella graminicola* (Cousin et al., 2006), respectivamente.

Nem todos os mutantes obtidos apresentaram as mutações etiquetadas. Nesse caso, o gene mutado pode ser isolado, com um pouco mais de trabalho, por complementação da linhagem mutante com um banco genômico. Três linhagens mutantes, do fungo ectomicorrízico *Hebeloma cylindrosporum*, deficientes na capacidade de micorrização foram isoladas a partir de um banco de transformantes obtidos por mutagênese insercional (Combiér et al., 2004). Após o cruzamento sexual e análise da segregação, verificou-se que em nenhum dos mutantes o gene mutado responsável pelo fenótipo estava etiquetado pela integração do vetor. Kunz et al. (2006) descreveram um mutante de *B. cinerea* obtido a partir de um banco de transformantes gerado por mutagênese insercional, mas que o gene mutado não foi etiquetado pelo plasmídeo utilizado na transformação.

A estratégia de mutagênese insercional normalmente requer uma metodologia de transformação eficiente, cuja integração do plasmídeo seja aleatória. Schiestl et al. (1991), ao transformarem *S. cerevisiae*, propuseram que a adição de enzima de restrição à mistura de transformação aumentava a eficiência de transformação em sete vezes. O evento de integração mediado pela enzima de restrição foi denominado de REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration”). Esses autores sugeriram que a enzima de restrição, utilizada durante a transformação, induziria quebras duplas no DNA genômico nos seus sítios de clivagem, gerando extremidades coesivas

compatíveis com o vetor linearizado com a mesma enzima. Por meio de sistemas de reparo de quebra dupla, o vetor é integrado no genoma, podendo regenerar o sítio de clivagem. Dessa forma, quando o DNA total dos transformantes é clivado com a mesma enzima utilizada na transformação, pode-se detectar um fragmento de DNA de mesmo tamanho que o vetor. Isso evidencia que os dois sítios de clivagem, presentes nas extremidades do vetor, foram perfeitamente regenerados durante a integração, esse evento é chamado “REMI verdadeiro”. No entanto, o sistema de reparo de quebra dupla pode não regenerar um dos sítios de clivagem, e até mesmo os dois, resultando em perda dos sítios de restrição.

Mutantes gerados a partir da transformação utilizando enzimas de restrição podem ser obtidos por outro mecanismo diferente da mutagênese insercional. As quebras provocadas no DNA genômico podem ser corrigidas erroneamente, sendo que em alguns casos, deleções e rearranjos foram observados. Quebras de fita dupla podem surgir como consequência da ação de enzimas de restrição, além da ação de topoisomerasas, radiações e agentes químicos. O reparo de quebras duplas no DNA de leveduras pode ocorrer via um processo reconhecido como reparo por ligação de terminais não homólogos (Schiestl et al., 1991; Moore et al., 1996; Zhu et al., 1996; Manivasakam et al., 1998; Lewis et al., 1999).

A integração de vetores lineares, sem a presença de enzima, ocorreria por outro mecanismo de recombinação não homólogo no qual regiões de microhomologia dos terminais fita simples do vetor atuariam na integração. Enzimas como topoisomerase I (Topo I) pode estar envolvida nesse tipo de recombinação em *S. cerevisiae* (Zhu et al., 1996).

Kuspa et al. (1992) obtiveram 20 a 60 vezes mais transformantes de *Dictyostelium discoideum* na presença da enzima de restrição utilizada na clivagem do plasmídeo. A integração do plasmídeo no genoma preservou, em mais de 70% dos transformantes, o sítio de restrição da enzima utilizada; sugerindo que os terminais compatíveis entre o plasmídeo e o genoma, gerados pela mesma enzima, são eventualmente reparados pela maquinaria de reparo da célula. Isso está de acordo com os resultados obtidos quando a enzima utilizada para a clivagem do plasmídeo foi diferente da utilizada durante o procedimento de transformação. Enzimas que geram terminais coesivos, por exemplo, *Bam*H1 e *Sau*3A1, acarretaram aumento na transformação, ao contrário do que ocorreu quando *Eco*R1 foi utilizada.

A transformação de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*C. lindemuthianum*) foi obtida utilizando-se os genes marcadores *amdS*⁺, que codifica para acetoamidase e permite o crescimento em acetamida como única fonte de nitrogênio, e *hygB*^R conferindo resistência à higromicina (Rodriguez et al., 1987). Apesar da baixa eficiência de transformação, 0,2 transformantes/ μ g, os transformantes foram estáveis após passarem por ciclos de repicagem em meios não seletivos.

Os genes *clk1*, *CLTA1*, *clap1*, foram isolados via mutagênese insercional em *C. lindemuthianum* e codificam proteínas consideradas fatores de patogenicidade e/ou virulência (Dufresne et al., 1998; Dufresne et al., 2000; Parisot et al., 2002). Estima-se que a porcentagem de obtenção de mutantes deficientes na patogenicidade seja 0,65% nessa espécie utilizando-se mutagênese insercional, o que demonstra a sua potencialidade na descobertas de novos genes envolvidos com esse processo.

Redman et al. (1994), trabalhando com essa mesma espécie de fungo, obteve de 1000 a 5000 transformantes/ μ g de vetor circular. A utilização do vetor linear e *HindIII* durante o procedimento de transformação dos protoplastos não modificou a eficiência de transformação; pelo contrário, reduções de até 5 vezes ocorreram utilizando-se 30U da enzima.

A clonagem do gene *Tox1* de *Cochliobolus heterostrophus* (Lu et al., 1994) foi realizada utilizando-se o REMI, sendo que de um total de 1310 transformantes, dois eram deficientes na síntese da toxina T e a mutação estava ligada ao marcador de seleção contido no plasmídeo usado na transformação. Foi verificado que a forma ativa ou inativa da enzima de restrição adicionada à suspensão de protoplastos influenciava a eficiência de transformação. A enzima contida na reação de clivagem foi capaz de aumentar cerca de 20 vezes a eficiência de transformação, e a adição posterior de enzima acabou por decrescer esse valor. Os dois mutantes *Tox1*⁻ foram gerados pela integração do plasmídeo em diferentes posições nesse locus e foi observada a regeneração do sítio de restrição da enzima utilizada durante a transformação, sendo, portanto um evento REMI verdadeiro.

Em *M. grisea*, foi relatado um aumento de aproximadamente 10 vezes na eficiência de transformação utilizando-se REMI (Shi et al., 1995). A eficiência variou com a concentração e a enzima utilizada, geralmente concentrações relativamente altas acabaram por diminuir a eficiência. Esse decréscimo não está relacionado com possíveis danos ao genoma, já que a viabilidade dos protoplastos não foi alterada. A utilização de enzimas que geram terminais abruptos causa um

pequeno efeito na eficiência de transformação, indicando que terminais coesivos compatíveis presentes no plasmídeo e no genoma são regenerados com maior eficiência. Após a análise de 600 transformantes, foram isolados dois mutantes morfológicos, um auxotrófico e dois relacionados com a patogenicidade.

Já em *U. maydi*, não se observou diferença na eficiência de transformação utilizando enzima de restrição no momento da transformação com o plasmídeo circular (Bölker, 1995). Após a análise do padrão de integração, pode-se concluir que a presença da enzima de restrição propiciou, em 90% dos transformantes, integrações únicas; ao contrário dos transformantes obtidos sem adição de enzima, onde o vetor teve integrações em tandem. Os resultados obtidos por esses autores demonstram que REMI é uma técnica eficiente para a etiquetagem gênica em *U. maydis*, sendo que de 1000 transformantes analisados, 1 a 2% foram incapazes de produzir os sintomas de patogenicidade nos testes realizados.

REMI foi aplicado para diversos fungos como *Alternaria alternata*, *Coprinus cinereus*, *Mycosphaerella zae-maydis*, *Glomerella graminicola*, *Dictyostelium discideum*, *Colletotrichum magna*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Aspergillus nidulans*, *A. oryzae* e *A. fumigatus*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Bipolaris oryzae*, *U. maydis*, *M. grisea* (Akamatsu et al., 1997; Granada et al., 1997; Sánchez, et al., 1998; Yun. et al., 1998; Epstein. et al., 1998; Barth et al., 1998; Tanaka. et al., 1999; Cantone. Et al., 1999; Yave. et al., 2000; Thon. et al., 2000; Souza et al., 2000; Lu et al., 2003; Moriwaki et al., 2004; Leuthner et al., 2005; Schirawski et al., 2005; Marchi et al., 2006) com os objetivos de aumentar a eficiência de transformação; isolar mutantes, principalmente deficientes na fitopatogenicidade, ou etiquetar genes para sua subsequente clonagem.

Esses trabalhos têm corroborado com a observação de que REMI é uma técnica muito eficiente para a etiquetagem de genes porque, em geral, leva a um aumento da eficiência de transformação, propicia integrações aleatórias no genoma da espécie transformada e favorece integrações únicas do vetor, diminuindo integrações em tandem, o que facilita a futura clonagem do gene mutado.

Alguns requerimentos são essenciais para a utilização eficiente do REMI. É necessário que o plasmídeo possua capacidade de replicação e seleção em *E. coli*, o que facilitará a recuperação do plasmídeo de um possível mutante de interesse; para selecionar as células transformantes deve ser utilizado um marcador dominante ou um marcador que complemente uma mutação auxotrófica, nesse caso, é preferível

que a seqüência do marcador não seja homóloga para propiciar integrações heterólogas; o vetor precisa ter sítios únicos de restrição; é necessário padronizar a melhor concentração de enzima que resulte na máxima eficiência.

O isolamento de genes de patogenicidade pode ser realizado pela técnica do gene candidato. Essa técnica baseia-se no conhecimento prévio e bem estabelecido do papel de um determinado gene na patogenicidade e/ou virulência de um determinado fitopatógeno. Dessa forma, busca-se o gene ortólogo na espécie de interesse e verifica-se o seu papel na patogenicidade pela geração de mutantes. Primeiramente, é necessário o isolamento do gene ortólogo seja por PCR com oligonuclotídeos degenerados, ou por meio de hibridização de bancos genômicos ou de cDNA usando sondas heterólogas. Os genes *CLNRI* (Pelletier et al., 2003) e *ClPLS1* (Veneault-Fourrey et al., 2005) relacionados com a patogenicidade de *C. lindemuthianum* foram isolados graças aos seus ortólogos *areA/nit-2* de *A. nidulans/N. crassa* e *PLS1* de *M. grisea*, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akamatsu, H.; Kodama, Y. I.; Otani, H.; Kohmoto, K. Aal- toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme mediated integration. *Phytopathology*. 87 (1997) 967 –72.
- Amorim, L. Avaliação de doenças. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H; Amorim, L. (Eds.). *Manual de Fitopatologia São Paulo* (1995) pp.647-671.
- Andrus, C.F.; Wade, B.L. The factorial interpretation of antracnose resistance in beans. Washington, U.S.D.A.(1942) 29p.
- Araújo, E. Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn.) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. Viçosa, MG: UFV, 1988, 114p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa.
- Arechiga-Carvajal, E.T.; Ruiz-Herrera, J.: The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* 4 (2005) 999-1008.
- Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet Biol* 40 (2003) 1-3.
- Bailey, J.A.; Jeger, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford (1992) 388p.
- Balhadere PV, Talbot NJ. *PDE1* encodes a P-type ATPase involved in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* . *Plant Cell*. 13 (2001) 1987–2004.
- Barr, C. M.; Neiman, M.; Taylor, D. R. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plant, fungi and animals. *New Phytologist* 168 (2005) 39-50.
- Barth, C.; Fraser, D. J.; Fisher, P. R. Co-insertional replication is responsible for tandem multimer formation during plasmid integration into the *Dictyostelium* genome. *Plasmid* 39 (1998) 141 – 153.
- Barrus, M.F. Variation of varieties of beans in theirs susceptibility to anthracnose. *Phytopathology* 1 (1911) 190-95.
- Barrus, M.F. Varietal susceptibility of beans to strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Brit. Et Cav. *Phytopathology* 8 (1918) 589-614.
- Bechinger, C.; Giebel K.F.; Schnell, M.; Leiderer, P.; Deising, H.B.; Bastmeyer, M. Optical measurements of invasive forces exerted by appresoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285 (1999) 1896–99.

- Begerow, D.; John, B.; Oberwinkler, F. Evolutionary relationships among [beta]-tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycological Research* 108 (2004) 1257-63.
- Berbee, M. L., Carmean, D. A.; Winka, K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the Ascomycota: how many nucleotides are enough? *Mol. Phylogenet.Evol.* 17 (2000) 337-44.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N., Jr. and Rogers, T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* 55 (2005) 1072-84.
- Bölker, M.; Böhnert, H. U.; Braun, K. H.; Görl, J.; Kahmann, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular General Genetics* 248 (1995) 547 – 552.
- Borém, A.; Carneiro, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; Paula Jr.; Borém, A. (Ed.) Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais. Viçosa (1998) pp.13-17.
- Briggs, S.P.; Ojal, G.S. Genetic patters of plant host-parasite interactions. *Trends in Genetics* 10(1994) 12-16.
- Bullerwell, C. E. ; Forget, L.; Lang, B. F. Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Res* 31(2003):1614-23.
- Bullerwell CE, Leigh, J.; Forget L, Lang BF A comparison of three fission yeast mitochondrial. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 759-68.
- Burger, G.; Gray, M. W.; Lang, B. F. Mitochondrial genomes: anything goes *TRENDS in Genetics* 19 (2003) 709-16.
- Burkholder, W.H. The gamma strains of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Brit. Et Cav.. *Phytopathology* 13 (1923) 316-23.
- Canteri, M.G.; Silva; O.C.; Pria; M.D.; Costa, J.L.S.; Souza, E.D.T.; Berni, R.F. Principais medidas de controle, In: Canteri, M.G.; Pria, M.D.; Silva, O.C. Principais doenças fúngicas do feijoeiro. Ponta Grossa (1999) 178p.
- Cantone, F. A.; Vandenberg, J. D. Genetic transformation and mutagenesis of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74 (1999) 281 –88.
- Caracuel, Z.; Roncero, M.I.; Espeso, E.A.; Gonzalez-Verdejo, C.I.; Garcia-Maceira, F.I.; Di Pietro, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48 (2003) 765-79.

- Caracuel, Z.; Casanova, C.; Roncero, M. I. G.; Di Pietro, A.; Ramos, J. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* 2 (2003) 1246-52.
- Carver, T.L.W.; Kunoh, H.; Thomas, B.J.; Nicholson, R.L. Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycol. Res.* 103 (1999) 547–60.
- Centis, S.; Dumas, B.; Fournier, J.; Marolda, M.; Tugayé, M.T.E. Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Gene* 170 (1996) 125-29.
- Centis, S.; Guillas, I.; Séjalon, N.; Tugayé, M.T.E.; Dumas, B. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10 (1997) 769-75.
- Chaves, G. La antracnosis. In: Schwartz; H.F.; Galvez, G.E. (eds) Problemas de producción del frijol. Cali (1980) pp. 37-53.
- CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical - <http://www.ciat.cgiar.org/index.html>.
- Clergeot, P.H.; Gourgues, M.; Cots, J.; Laurans, F.; Latorse, M.P.; Pepin, R.; Tharreau, D.; Notteghem, J.L.; Lebrun, M.H. *PLS1*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6963–68.
- Combiér, J. P.; Melayah, D.; Raffier, C.; Pépin, R.; Marmeisse, R.; Gay, G. Nonmycorrhizal (Myc-) Mutants of *Hebeloma cylindrosporium* obtained through insertional mutagenesis *MPMI* 17 (2004) 1029–38.
- Comménil, P.; Belingheri, L.; Dehorter, B. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 52 (1998) 1–14.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (<http://www.conab.gov.br/conabweb/>)
- Cousin, A.; Mehrabi, R.; Guilleroux, M.; Dufresne, M.; Lee, T. V. D.; Waalwijk, C.; Langin, T.; Kema, G. H. J. The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and *in vitro* pycnidia formation *Molecular Plant Pathology* 7(2006) 269–78.

- Cummings, D. J.; McNally, K. L.; Domenico, J. M.; Matsuura, E.T. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr Genet* 17 (1990) 375–402.
- Damasceno e Silva, K. J.; deSouza, E. A.; Ishikawa, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Phytopathology* 155 (2007) 241-47.
- Dangl, J.; Holub, E. La dolce vita: A molecular feast in plant-pathogen interactions. *Cell*, 91 (1997) 17-24.
- Davis, D.; Edwards, J.E. Jr.; Mitchell, A.P.; Ibrahim, A.S. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68 (2000) 5953-9.
- De Bernardis, F.; Muhlschlegel, F.A.; Cassone, A.; Fonzi, W.A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66 (1998) 3317-25.
- De Jong, J.C.B.; McCormack, B.J.; Smirnov, N.; Talbot, N.J. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389 (1997) 244-45.
- Dean, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review Phytopathology* 35 (1997) 211-34.
- Drori, N.; Haimovich, H. K.; Rollins, J.; Dinooor, A.; Okon, Y; Pines, O.; Prusky, D. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) 3258-62.
- 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.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A.L.; Bailey, J.A.; Langin, T. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell* 12 (2000) 1579-89.
- Dumas, B.; Centis, S.; Sarrazin, N.; Tugayé, M.T.E. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 1769-1771.
- Dumas, B.; Borel, C.; Herbert, C.; Maury, J.; Jacquet, C.; Balsse, R.; Esquerré-Tugayé, M. T. Molecular characterization of *CLPT1*, a SEC4-like Rab/GTPase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* which is regulated by the carbon source. *Gene* 272 (2001) 219- 25.

- Duyvesteijn, R. G. E.; van Wijk, R.; Boer, Y.; Rep, M.; Cornelissen, B. J. C.; Haring, M. A. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato *Molecular Microbiology* 57 (2005) 1051–63.
- Ebel, J.; Scheel, D. Signals in host-parasite interactions. *In: The Mycota Vol. 5, Plant Relationships Part A.* Carroll, G.C.; Tudzynski, P. (eds) Heidelberg (1997) pp 85–105.
- Endo, T.; Yamamoto, H.; Esaki, M. Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles *J. Cell Sci.* 116 (2003) 3259–67.
- Epstein, L.; Lusnak, K.; Kaur, S. Transformation mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Fungal Genetics and Biology* 23 (1998) 189 – 203.
- Fabre, J.V.; Julien, J.; Parisot, D.; Dron, M. Analysis of diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycological Research* 99 (1995) 429-35.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://apps.fao.org/>)
- Fernandez-Martinez, J.; Brown, C.V.; Diez, E.; Tilburn, J.; Arst, H.N. Jr.; Penalva, M.A.; Espeso, E.A. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334 (2003) 667-84.
- Fierro, F.; Martín, J.F. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement in fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 25(1999) 1-17.
- Flaherty, J. E.; Pirttilä, A. M.; Bluhm, B. H.; Woloshuk, C. P. *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides* *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2003) 5222-27.
- Flaishman, M.A.; Kolattukudy, P.E. Timing of fungi invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91 (1994) 6579-6583.
- Flaishman, M.A.; Hwang, C.H.; Kolattukudy, P.E. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. *Physiological Molecular Plant Pathology* 47 (1995) 103-117.
- Flor, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9 (1971) 275-296.
- Forget, L.; Ustinova, J.; Wang, Z.; Huss, A. R.; Lang, F. B. *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Mol Biol Evol* 19 (2002) 310–19.

- Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 82 (1998) 596–605.
- Freeman, S.; Pham, M.; Rodriguez, R. J. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* 17 (1993) 309-22.
- Gabriel, D.W. Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (1999) 205-214.
- Geffroy, V.; Sicard, D.; de Oliveira, J. C. F.; Sévignac, M.; Cohen, S.; Gepts, P.; Neema, C.; Langin, T.; Dron, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 (1999) 774-84.
- Goodwin, S. B. Minimum phylogenetic coverage: an additional criterion to guide the selection of microbial pathogens for initial genomic sequencing efforts. *Phytopatology* 94 (2004) 800-04.
- Granado, J. D.; Chaloupková, K. K.; Aebi, M.; Kües, U. Restriction enzyme mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Molecular General Genetics* 256 (1997) 28 – 36.
- Gray, M.W.; Burger, G.; Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Nature* 283 (1999) 1476–81.
- Guzman, P.; Donado, M. R.; Galves, G.E. Perdidas econômicas causadas por la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) em Colombia. *Turrialba* 29 (1979) 65-67.
- Hammond-Kosack, K.; Jones, J. Responses to Plant Pathogens In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. Jones Rockville (2000).
- Herbert, C.; Jacquet, C.; Borel, C.; Esquerré-Tugayé, M.T.; Dumas, B. A *cis*-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(2002) 29125-31.
- Herbert, C.; O'Connell, R.; Gaulin, E.; Salesses, V.; Esquerré-Tugayé, M.T.; Dumas, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology* 41 (2004) 140-147.

- Herranz, S.; Rodriguez, J.M.; Bussink, H.J.; Sanchez-Ferrero, J.C.; Arst, H.N.Jr.; Penalva, M.A.; Vincent, O. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12141-6.
- Howard, R.J.; Valent, B. Breaking and entering – host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* 50 (1996) 491–512.
- Hughes, H.B.; Carzaniga, R.; Rawlings, S.L.; Green, J.R.; O’Connell, R. J. Spore surface glycoproteins of *Colletotrichum lindemuthianum* are recognized by a monoclonal antibody which inhibits adhesion to polystyrene. *Microbiology* 145 (1999) 1927-36.
- Hutchison, K.A.; Perfect, S.; O’Connell, R.J.; Green, J.R. Immunomagnetic purification of *Colletotrichum lindemuthianum* appressoria. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 3464-67.
- Hwang, C.H.; Flaishman, M.A.; Kolattukudy, P.E. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell* 7 (1995) 183-93.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (<http://www.ibge.gov.br/>)
- Idnurm, A.; Howlett, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2 (2001) 241-55.
- Jacobs, A.; Coetzee, M. P. A.; Wingfield, B.; Jacobs, K; Wingfield, M. J. Phylogenetic relationships among *Phialocephala* species and other ascomycetes *Mycologia* 95 (2003) 637–45.
- Kahmann, R.; Basse, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and plant colonization. *Current Opinion in Microbiology* 4 (2001) 374-80.
- Kim, Y.K.; Li, Z.M.L.D.; Kolattukudy, P.E. Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *Journal of Bacteriology* 182 (2000) 4688-95.
- Kim, Y.-K.; Wang, Y.; Liu, Z. M.; Kolattukudy, P. E. Identification of a hard surface contact-induced gene in *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a sterol glycosyltransferase, a novel fungal virulence factor. *Plant J* 30 (2002) 177–187.
- Kouvelis, V.N.; Ghikas, D. V.; Typas, M. A. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications. *Fungal Genet Biol* 41 (2004) 930–40

- Kubo, Y.; Nakamura, H.; Kobayashi, K; Okuno, K; Furusawa, I. Cloning of melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular Plant-Microbe Interact* 5 (1991) 440-445.
- Kunz, C.; Vandelle, E.; Rolland, S.; Poinssot, B.; Bruel, C.; Cimerman, A.; Zotti, C; Moreau, E.; Vedel, R.; Pugin, A.; Boccara, M. Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity *New Phytologist* 170 (2006) 537–50.
- Kurland, C. G.; Andersson, S. G. E. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 786–820.
- Kuspa, A.; Loomis, W. F. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8803 –07.
- Lajolo, F.; Genovese, M.I.; Menezes, E.W. Qualidade nutricional. In: Araújo, R.S.; Rava, C.A.; Stone, L.F.; Zimmermann, M.J.O. (eds) *Cultura do feijoeiro no Brasil*. Piracicaba (1996) pp.23-56.
- Lambert, M.; Blanchin-Roland, S.; Le Louedec, F.; Lepingle, A.; Gaillardin, C. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 3966-76.
- Langfelder, K.; Streibel, M.; Jahn, B.; Haase, G.; Brakhage, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 38 (2003) 143-158.
- Latunde-Dada, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2 (2001) 187-98.
- Lebeda, A.; Jancová, D.; Luhova, L. Enzymes in fungal plant pathogenesis. *Phyton* 39 (1999) 51-6.
- Leger, R.J.S.T.; Joshi, L.; Roberts, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1998) 709-13.
- Leuthner, B.; Aichinger, C.; Oehmen, E.; Koopmann, E.; Müller, O.; Müller, P.; Kahmann, R.; Bölker, M.; Schreier, P. H. H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis* *Mol Gen Genomics* (2005) 272: 639–50.
- Lewis, L. K.; Westmoreland, J. W.; Resnick, M. A. Repair of endonuclease-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*: essential role for genes associated with nonhomologous end-joining. *Genetics* 152 (1999) 1513 – 29.

- Li, D.; Ashby, A. M.; Johnstone, K. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (2003) 545-52.
- Lister, R.; Hulett, J. M.; Lithgow, T.; Whelan, J. Protein import into mitochondria: origins and functions today (Review). *Molecular Membrane Biology* 22 (2005) 87 – 100.
- Liu, Z.-M.; 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. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3592–97.
- Lu, S.; Lyngholm, L.; Yang, G.; Bronson, C.; Yoder, O. C.; Turgeon, B. G. Tagged mutations at the *Tox 1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91 (1994) 12649–53.
- Lu, S.W.; Kroken, S.; Lee, B. N.; Robbertse, B.; Churchill, A. C. L.; Yoder, O. C.; Turgeon, B. G. A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. *PNAS* 100 (2003) 5980-85.
- MacCabe, A. P.; van denHomergh, J. P. T. W.; Visser, J.; Tilburn J.; Arst Jr., H. N.: Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Molecular and General Genetics* 250 (1996) 367-74.
- Maccheroni Jr., W.; Welington, L. A.; Azevedo, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum* *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 61 (2004) 298-302.
- Machado, J.C. Padrões de tolerância a patógenos associados à semente. *Revisão anual de patologia de plantas* 2 (1994) 229-63.
- Manivasakam, P.; Schiestl, R. H. Nonhomologous end joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 18 (1998) 1736–45.
- Manteau, S.; Abouna, S.; Lambert, B.; Legendre, L. Differential regulation by pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* 43 (2003) 359-66.
- Mendgen, K.; Hahn, M.; Deising, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34 (1996) 367-86.
- Menezes, J.R. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn) Scrib. em *Phaseolus vulgaris* L. Brasília, DF:UNB, 1985, 65p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, 1985.

- Mokranjac, D.; Neupert, W. Protein import into mitochondria *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 1019–23.
- Moore, J. K.; Haber, J. E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16 (1996) 2164–73.
- Moriwaki, A.; Kihara, J.; Kobayashi, T.; Tokunaga, T.; Arase, S.; Honda, Y. Insertional mutagenesis and characterization of a polyketide synthase gene (*PKSI*) required for melanin biosynthesis in *Bipolaris oryzae* *FEMS Microbiology Letters* 238 (2004) 1–8.
- Negrete-Urtasun, S.; Denison, S.H.; Arst Jr, H.N. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1832–35.
- Neupert, W. Protein import into mitochondria. *A. Rev. Biochem.* 66 (1997) 683–717.
- O’Connell, R.J.; Bailey, J.A.; Richmon, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum* *Physiological Plant Pathology* 27 (1985) 75–98.
- O’Connell, R.J.; Bailey, J.A.; Vose, I.R.; Lamb, C.J. Immuno-gold labeling of fungal antigens in cells of *Phaseolus vulgaris* infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 28 (1986) 99–105.
- O’Connell, R.J. Absence of a specialised interface between infection hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 107 (1987) 725–34.
- O’Connell, R.J.; Pain, N.A.; Hutchison, K.A.; Jones, G.L.; 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) 204–12.
- Oliari, L.; Vieira, C.; Wilkinson, R.E. Physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Plant Disease Reporter* 10 (1973) 870–872.
- Oliveira, E.A.; Antunes, I.F.; Costa, J.G.C. Bean anthracnose race survey in south Brazil. In: *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 16 (1973) 42–3.
- O’Sullivan, D.; Tosi, P.; Creusot, F.; Cooke, M.; Phan, T.H.; Dron, M.; Langin, T. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* *Current Genetics* 33 (1998) 291–8.

- Pain, N.A.; O'Connell, R.J.; Mendgen, K.; Green, J.R. Identification of glycoproteins specific to biotrophic intracellular hyphae formed in the *Colletotrichum lindemuthianum*-bean interaction. *New Phytopathology* 127 (1994) 233-42.
- Pantou, M. P.; Kouvelis, V. N.; Typas, M. A. The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*: a novel gene order for *Verticillium* and a diagnostic tool for species identification. *Curr Genet* (2006) 125-36.
- Paquin, B. P.; Laforest, M-J.; Forget, L.; Roewer, I.; Wang, Z.; Longcore, J.; Lang, B. F. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr Genet* 31 (1997) 380-95
- Parisot, D.; Dufresne, M.; Veneault, C.; Laugé, R.; Langin, T. *clal*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetic Genomics* 268 (2002) 139-51.
- Park, G.; Xue, G.Y.; Zheng, L.; Lam, S.; Xu, J.R. *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 (2002) 183-92.
- Pascholati, S.F.; Deising, H.; Leite, B.; Anderson, D.; Nicholson, R.L. Cutinase e non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42 (1993) 37-51.
- Pellier, A.L.; Laugé, R.; Veneault-Fourrey, C.; Langin, T. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology* 48 (2003) 639-55.
- Peñalva, M.A.; Arst, H. N. Jr Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (2002) 426-46.
- Perfect, S.E.; O'Connell, R.J.; Green E.F.; Doering, C.; Green, J.R. Expressing cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. *Plant Journal* 15 (1998) 273-9.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J.; Green, J. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interaction. *Fungal Genet. Biol.* 27 (1999) 186-98.
- Perfect, S.E.; Pixton, K. L.; O'Connell, R.J.; Green, J.R. The distribution and expression of a biotrophy-related gene, *CIH1*, within the genus *Colletotrichum*. *Molecular Plant Pathology* 1 (2000) 213-21.

- Pria, M.D.; Silva, O.C.; Costa, J.L.S.; Souza, E.D.T.; Berni, R.F. Diagnose das doenças. In: Canteri, M.G.; Pria, M.D.; Silva, O.C. (eds) Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa (1999) pp.17-34.
- Prusky, D.; Mcevoy, J.L.; Leverentz, B.; Conway, W.S. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant Microbe interact* 14 (2001) 1105-13.
- Ramon, A. M.; Porta, A.; Fonzi, W. A.: Effect of Environmental pH on Morphological Development of *Candida albicans* Is Mediated via the PacC-Related Transcription Factor Encoded by *PRR2* *Journal of Bacteriology* 181(1999) 7524-30.
- 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.
- Redman, R. S.; Rodriguez, R. J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental mycology* 18 (1994) 230–46.
- Reis, H.; Pfiffi, S.; Hahn, M. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 6 (2005) 257–67.
- Roca, M. M. G.; Ongarelli, M. G.; Davide, L. C.; Costa, M. C. M. Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* *Brazilian Journal of Microbiology* 31 (2000) 223-5.
- Rodriguez, R.J.; Yoder, O.C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *Phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene* 34 (1987) 73-81.
- Rogers, L.M., Flaishman, M.A.; Kolattukudy, P.E. Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f.sp. *pisi* decreases its virulence on pea. *Plant Cell* 6 (1994) 935–45.
- Rogers, L.M., Kim, Y.K., Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., Li, D. and Kolattukudy, P.E. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria haematococca*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 9813–18.
- Rollins, J.A.; Dickman, M.B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIMI* homolog. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 75-81.
- Rollins, J.A.: The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 785-95.
- Sánchez, O.; Navarro, R. E.; Aguirre, J. Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction

- enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular General Genetic* 258 (1998) 89–94.
- Schäfer, W. The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiol.* 1 (1993) 69-71.
- Schiestl, R. H.; Petes, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88 (1991) 7585-89.
- Schirawski, J.; Böhnert, H. U.; Steinberg, G; Snetselaar, K.; Adamikowa, L.; Kahmanna, R. Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* 17 (2005) 3532-43.
- Shaner, G.; Stromberg, E.L.; Lacy, G.H.; Barker, K.R.; Pirone, T. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review Phytopathology* 30 (1992) 47-66.
- Sherriff, C.; Whelan, M.J.; Arnold, G.M. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species grouping in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18 (1994) 121-38.
- Shi, Z.; Christian, D.; Leung, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathology* 85 (1995) 329–33.
- Sicard, D.; Michalakis, Y.; Dron, M.; Neema, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of origin of its wild host *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87 (1997) 807-13.
- Silva-Wanderlei, D.; Neto, E. R.; Hanlin, R. H. Molecular systematics of the Phyllachorales (Ascomycota, Fungi) based on 18S ribosomal DNA sequences. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2003) 315-22.
- Siriputthaiwan, P.; Jauneau, A.; Herbert, C.; Garcin, D.; Dumas, B. Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Cell Science* 118 (2005) 323-29
- Souza, C. C.; Goldman, M. H. S.; Goldman, G. H. Tagging of genes involved in multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* *Molecular General Genetics* 263 (2000) 702: 11.
- Stenkamp, E. T.; Wright, J.; Baldauf, S. L. The Protistan Origins of Animals and Fungi. *Molecular Biology and Evolution* 23 (2006) 93-106.
- Sutton, B. *The Coelomycetes*. CMI, England. (1980) pp.524-537.

- Sutton, B The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. .A.; Jeger, M.J. (eds) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford England. (1992) pp.1-26.
- Takano, Y.; Takayanagi, N.; Hori, H.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, T.; Kimura, A.; Okuno, T. A gene involved in modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of *Colletotrichum lagenarium* *Molecular Microbiology* 60 (2006) 81–92.
- Talamini, V.; Souza, E. A.; Pozza, E. A.; Silva, G. F.; Ishikawa, F. H.; Júnior, O. A. C. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD *Fitopatol. bras.* 31 (2006) 545-50.
- Talbot, N.J.; Kershaw, M.J.; Wakley, G.E.; DeVries, O.M.H.; Wessels, J.G.H.; Hamer, J.E. MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 8 (1996) 985–99.
- Tanabe, Y.; Saikawa, M.; Watanabe, M. M.; Sugiyama, J. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 α and RPB1 sequences: Limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30 (2004) 438–49.
- Tanaka, A.; Shiotani; H.; Yamamoto, M.; Tsuge, T. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the hort-specific AK-toxin in the japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (1999) 691–702.
- Thomazella, C.; Gonçalves-Vidigal, M.C.; Vida, J.B.; Vidigal Filho, P.S. Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* no estado do Paraná. *Anuário 1999/2000*, <http://www.cca.uem.br/indiceanuario.htm>;
- Thompson, J.E.; Fahnestock, S.; Farrall, L.; Liao, D.I.; Valent, B. ;Jordan, D.B. The second naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea* tetrahydroxynaphthalene reductase. *Journal Biological Chemical* 275 (2000) 34867-72.
- Thon, M. R.; Nuckles, E. M.; Vaillancourt, L. J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (2000) 1356–65.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 14 (1995) 779- 90.
- Tucker, S.L.;Talbot, N.J. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39 (2001) 385– 417.
- Veneault-Fourrey, C.; Parisot, D.; Gourges; M.; Laugé, R.; Lebrun, M. H.; Langin, T. The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated

- penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Fungal Genet Biol. 42 (2005) 306-18.
- Vieira, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa (1988) 231p.
- Wit, P.J.G.M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends in Plant Science 2 (1997) 452-8.
- Wit, P.J.G.M.; Joosten, M.H.A.J. Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato infection. Current Opinion in Microbiology 2 (1999) 368-73.
- Woo, P. C. Y.; Zhen, H.; Cai, J. J.; Yu, J.; Lau, S. K. P.; Wang, J.; Teng, J. L. L.; Wong, S. S. Y.; Tse, R. H.; Chen, R.; Yang, H.; Liu, B.; Yuen, K.-Y. The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is more closely related to those of molds than yeasts. FEBS Lett. 555 (2003) 469-77.
- Xu, J.R.; Staiger, C.J.; Hamer, J.E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase *MPS1* from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defence responses. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 12713-18.
- Xu, J.R.; Urban, M.; Sweigard, J.A.; Hamer, J.E. The *CPKA* gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorium penetration. Mol Plant-Microbe Interact 10 (1997) 187-94.
- Yaver, D. S.; Lamsa, M.; Munds, R.; Brown, S. H.; Otani, S.; Franssen, L.; Johnstone, J. A.; Brody, H.; Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology 29 (2000) 28-37.
- Yerkes, W.D.J. Additional new races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. Plant Diseases Report 42 (1958) 329-34.
- Yerkes, W.D.J.; Ortiz, M.T. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. Phytopathology 46 (1956) 564-7.
- Yokoyama, L. P.; Bano, K.; Kluthcouski, J.; Aspectos econômicos da cultura. In: Araújo, R. S.; Rava, C. A.; Stone, L. F.; Zimmermann, N. J. O. (Ed.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba (1996) pp.1-20.
- Yun, S. H.; Turgeon, B. G.; Yoder, O. C. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. Physiological and Molecular Plant Pathology 52 (1998) 53-66.
- Zhu, J.; Schiestl, R. H. Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology 16 (1996) 1805-12.

Zimmermann, M.J.O.; Teixeira, M.G. Origem e evolução. In: Araújo,R.S.;Rava, C.A.; Stone, L.F.; Zimmermann, M.J.O. (eds) Cultura do feijoeiro no Brasil. Piracicaba (1996) pp.57-99.

CAPITULO I

ISOLAMENTO DE MUTANTES DE *Colletotrichum lindemuthianum* DEFICIENTES NA INFECÇÃO DO FEIJOEIRO POR MEIO DE REMI (INTEGRAÇÃO MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO) E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES INATIVADOS

1. RESUMO

Mutantes de *Colletotrichum lindemuthianum* deficientes na patogenicidade e virulência foram isolados a partir de um banco de transformantes obtidos por meio de REMI (integração mediada por enzima de restrição). A utilização da enzima de restrição *NarI* e do plasmídeo, previamente, linearizado aumentou 10X a eficiência de transformação desse fitopatógeno. Uma linhagem não patogênica, denominada mut5, e outras duas com virulência reduzida, mut29 e mut 65, foram isoladas num total de 580 transformantes testados em folhas de feijoeiro excisadas. O resultado da observação citológica da cinética de infecção demonstrou que a linhagem mutante mut5 penetra, raramente, no tecido do hipocótilo de feijoeiro, pela observação de hifas primárias, mas foi incapaz de desenvolver hifas secundárias características da fase necrotrófica. Não foi observada a penetração das linhagens mut29 e mut65 no tecido do hipocótilo, apesar destas linhagens causarem sintomas da antracnose nas folhas do feijoeiro. Este resultado indica que as linhagens mut29 e mut65 variam o fenótipo, de acordo com o tecido vegetal utilizado nas observações. Os genes inativados foram recuperados por meio de transformação de *Escherichia coli* com o DNA total das linhagens mutantes clivado com a enzima *HindIII*. O seqüenciamento dos plasmídeos, recuperados dos mutantes 29 e 65, mostrou que eventos REMI são possíveis durante a integração de plasmídeos no genoma de *C. lindemuthianum*. As análises das seqüências mostraram que os genes que codificam tetrahydrofolato sintase (mut 65) e fosfolipaseC (mut29) foram interrompidos pela inserção do vetor durante a transformação, denominados respectivamente de *tlsCl* e *plcCl*. O gene para o transportador do tipo MSF (mut29), denominado *msfCl*, não foi interrompido mas o vetor inseriu-se na região 3' do mesmo. Os genes *plcCl* e *mdfCl* são expressos constitutivamente em *C. lindemuthianum* durante a infecção no tecido do feijoeiro. A mutagênese direcionada desses genes, em *C. lindemuthianum*, poderá confirmar seus papéis na patogenicidade deste importante fitopatógeno.

2. INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi & Cavara, agente causal da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tem seu processo de infecção bem conhecido. Esse fungo é capaz de se nutrir no hospedeiro de duas formas (O' Connell et al., 1985; Latune-Dada, 2001). A primeira fase, os conídios germinam sobre a camada de cutícula pelo lançamento do tubo germinativo que, em seguida, diferencia-se formando o apressório melanizado, necessário à penetração da primeira célula vegetal. Após a penetração da primeira célula do tecido hospedeiro, as hifas primárias crescem entre as células vegetais sem ocasionar a morte das mesmas, caracterizando a fase biotrófica da infecção. Depois de quatro dias da germinação do conídio, sintomas típicos da antracnose podem ser diferenciados macroscopicamente. Isto coincide com a diferenciação de hifas, ditas secundárias, mais finas do que as primárias, mas que, ao contrário destas, são capazes de matar as células vegetais para obtenção de nutrientes, caracterizando a segunda fase, conhecida como necrotrófica. Ao final de 10 dias, pode-se observar a diferenciação de acérvulos no tecido vegetal, fechando o ciclo de vida assexual deste fitopatógeno. Por apresentar as fases de nutrição biotrófica e necrotrófica, este fungo é considerado um fitopatógeno hemibiotrófico.

No processo de infecção, considerando desde a deposição do conídio sobre o tecido vegetal até à formação de acérvulos, ocorre diferenciação de diversas estruturas como o tubo germinativo, apressório, hifa peg de penetração, vesícula de infecção, hifas primárias e secundárias. A formação dessas estruturas é controlada, temporalmente, pois ocorre sequencialmente, como também espacialmente durante o processo de colonização do hospedeiro, sendo necessário um fino controle da expressão de genes, que promovam a diferenciação dessas estruturas no fitopatógeno. O fungo *C. lindemuthianum* é um excelente modelo para estudo genético de determinantes de patogenicidade. Além de ser facilmente cultivável em condições de laboratório, ele apresenta as fases biotrófica e necrotrófica durante a sua infecção no hospedeiro.

Técnicas de mutagênese por inserção, empregando plasmídeos, têm sido utilizadas para o isolamento de mutantes e detecção de genes, que codificam fatores de patogenicidade. Os genes *clk1*, *clap1* e *CLTA1* foram isolados da seleção de mutantes não patogênicos e, ou com virulência reduzida, a partir de um banco de

transformantes obtidos por mutagênese insercional de *C. lindemuthianum* (Dufresne et al., 1998, 2000; Parisot et al., 2002). Uma das grandes vantagens desta técnica é a descoberta de novos genes relacionados com a patogênese sem conhecimento prévio da função dos mesmos.

A técnica conhecida como REMI (Integração mediada por enzima de restrição) constitui uma modificação das técnicas de mutagênese, usando plasmídeos. Foi utilizada, pela primeira vez por, Schiestl et al. (1991) em *Saccharomyces cerevisiae*. O uso de REMI levou a um aumento significativo na eficiência de transformação de diversos fungos filamentosos como: *Magnaphorthe grisea* (Shi et al., 1995; Marchi et al., 2006); *Alternaria alternata* (Akamatsu et al., 1997); *Aspergillus nidulans* (Souza et al., 2000), *Colletotrichum graminicola* (Thon et al., 2000) e *Monacrosporium sphaeroides* (Jin et al., 2005). A utilização de REMI possibilita a geração de maior número de transformantes com integrações únicas, o que facilita a recuperação da seqüência interrompida; aliada à aleatoriedade do processo de integração do vetor no genoma da célula, além de aumentar a freqüência de transformação (Brown et al., 1998; Casas-Flores et al., 2004).

REMI baseia-se na adição de enzima de restrição aos plasmídeos e às células que serão transformadas. Ainda não é bem conhecido o mecanismo de atuação da mesma, mas supõe-se que essa enzima entraria em contato com o DNA genômico da célula receptora, gerando quebras na dupla fita de DNA no seu sítio de restrição. Essas quebras seriam reparadas com os terminais livres do plasmídeo utilizado na transformação e também linearizado com a mesma enzima de restrição, levando à interrupção da seqüência gênica.

Após o isolamento de um transformante com o fenótipo desejado, pode-se clivar o DNA dessa linhagem com enzima de restrição que não clive dentro da seqüência do plasmídeo integrado, ou mesmo que clive uma vez, para recuperá-lo. Espera-se que o plasmídeo recuperado contenha seqüências flanqueadoras de DNA genômico. Este DNA pode ser seqüenciado para a identificação do gene interrompido que levou ao fenótipo observado, e ainda usado como sonda no isolamento do gene de um banco genômico. O próprio plasmídeo recuperado pode ser introduzido na linhagem selvagem para que, por meio de recombinação homóloga, o gene seja novamente interrompido, confirmando sua função pela obtenção de mutantes com o mesmo fenótipo observado inicialmente.

O objetivo deste trabalho foi identificar e isolar novos genes determinantes de patogenicidade ou de virulência em *C. lindemuthianum*, por meio de mutagênese insercional. Neste trabalho, são descritos o isolamento de três linhagens com alteração no padrão de infecção do feijoeiro comum e a análise dos plasmídeos recuperados dessas linhagens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

O fungo *C. lindemuthianum*, isolado LV49 (raça 81) pertencente a Micoteca do Departamento de Genética da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado como linhagem selvagem em todos os experimentos. A linhagem selvagem e os transformantes obtidos foram mantidos em meio de cultura BDA à temperatura de 21°C.

Culturas de sete dias crescidas em vagens autoclavadas, foram utilizadas para obtenção da suspensão 1×10^8 conídios/mL. Para extração de DNA total e RNA total, um mL dessa suspensão foi inoculado em meio GPYECH (20g de glicose, 5g de peptona, 1g de extrato de levedura e 1g de caseína hidrolisada L^{-1}) mantidos à 21°C, durante 48h. Após o crescimento, o micélio foi lavado com água destilada, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até sua utilização.

3.2. Isolamento de ácidos nucleicos

Plasmídeos, propagados em *Escherichia coli* (Invitrogen), foram isolados usando o kit QIAprep Spin (Qiagen, Hilden, Alemanha). A extração do DNA total de *C. lindemuthianum* foi realizada conforme descrito por Specht et al. (1982).

RNA total foi extraído do micélio usando o reagente Extract-All (Eurobio, Lês Ulis, França). RNA total das folhas de feijoeiro, inoculadas com a linhagem selvagem de LV49, foi isolado por meio do método de extração com fenol quente (Veneault-Fourrey et al., 2005). O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria.

3.3. Transformação do *C. lindemuthianum*

O vetor pAN7-1 (Punt et al., 1987), contendo o gene que confere resistência a higromicina, foi utilizado nos experimentos de transformação. O micélio crescido em meio GPYG líquido durante 48h, foi lavado e colocado em Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de solução de protoplastização (glucanex 200 mg, tampão fosfato 10 mM, KCl 0,8 mol/L). Os protoplastos obtidos foram lavados 3X em solução STC (sorbitol 1 mol/L, CaCl_2 50 mM, tampão TrisHCl 10 mM). Ao final das lavagens, os protoplastos foram ressuspensos em STC numa concentração de 1×10^8 protoplastos/mL. Em um tubo, foram adicionados 200 μL da suspensão de

protoplastos, 5 µg do vetor pAN7.1 e 50 µL de PEG 6000 60% preparado em STC e mantidos no gelo. Após 20 min, foram acrescentados 500 µL da solução de PEG 6000 e o tubo foi mantido à temperatura ambiental durante 20 min. Ao final desse período, os protoplastos foram plaqueados em meio BDA, contendo sacarose 0,56 mol/L como estabilizador osmótico. Após 48 h de regeneração dos protoplastos, um novo meio BDA contendo higromicina 100 µg/mL de meio de cultura foi adicionado sobre as placas de Petri. Os micélios transformantes resistentes à higromicina foram repicados para placas contendo meio de cultivo, acrescidas de 50 µg/mL de higromicina, sendo posteriormente, purificados pelo isolamento monospórico. A estabilidade da resistência foi testada, repicando-se repetidamente o transformante em meio não seletivo e, posteriormente, passando para meio seletivo contendo higromicina.

Os efeitos do estado físico do plasmídeo (linear ou circular) e a presença ou ausência da enzima de restrição ativa foram testados em relação à eficiência de transformação de *C. lindemuthiaum*. A enzima *NarI*, que apresenta apenas um sítio de restrição dentro da seqüência do pAN7.1, foi escolhida para a linearização do plasmídeos e para os experimentos de transformação. Os seguintes experimentos foram realizados: **C** – plasmídeo circular, sem presença de enzima de restrição; **L** – plasmídeo linearizado com *NarI* mantendo-se a enzima ativa após a clivagem do pAN7.1; **L-IN** – plasmídeo linearizado, sendo a enzima de restrição, utilizada na sua clivagem, inativada por calor; **L + E** – tratamento L acrescido da enzima *NarI* no momento da transformação.

3.4. Testes de patogenicidade

Plantas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. Rosinha foram utilizadas, como cultivar susceptível, nos ensaios de patogenicidade. Sementes foram germinadas e as plântulas de feijoeiro foram mantidas em câmara de crescimento por sete dias. A superfície das folhas cotiledonares excisadas foi inoculada com uma suspensão de 1×10^6 conídios/mL. Essas folhas foram mantidas em placas de Petri, contendo discos de filtro de papel embebidos em água e incubadas a 19°C, em câmara de luz com 8h de escuro e 16h de luz ($166 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). Seis folhas foram utilizadas para cada linhagem transformante testada. Os sintomas foram observados de 5 a 7 dias após a inoculação. Os isolados, que demonstraram redução na

virulência ou perda de patogenicidade, foram posteriormente inoculados em plantas mantidas em casa de vegetação, para confirmação do fenótipo.

3.5. Observação do processo infeccioso por microscopia de fluorescência

As estruturas fúngicas presentes no tecido vegetal foram coradas com azul de anilina e observadas em microscópio de fluorescência. O tecido epidermal foi destacado com auxílio de um estilete, clarificado duas vezes durante 10 min em KOH 1M a 70°C e montado em K₂HPO₄ 67 mM pH 9,0 contendo azul de anilina 0,1%. Foi realizada microscopia de epifluorescência em microscópio Axioskop (utilizando-se os filtros BP365, FT 395, LP397 com luz UV no comprimento de onda de 340 a 380 nm) (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as fotografias digitais foram realizadas em câmara de vídeo (Sony, Köln, Alemanha), acoplada ao computador.

3.6. Recuperação do plasmídeo

O DNA total das linhagens mutantes foi clivado com as enzimas de restrição *Kpn*I, que não apresenta sítio dentro da seqüência do vetor pAN7.1 ou ainda com *Hind*III que apresenta um único sítio nesse plasmídeo.

Os fragmentos totais, obtidos nessa clivagem foram religados por meio de T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação de ligação foi utilizada para transformar células ultracompetentes de *E. coli* DH5 α . Células transformantes foram selecionadas em meio LB, suplementado com 50 μ g/mL de ampicilina.

3.7. Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências

O DNA foi seqüenciado pelo procedimento de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977), usando o kit ^{T7}Sequencing (Pharmacia Biotech S.A., Saint Quentin-en-Yvelines, Roissy, France) ou o kit ABI PRISM (Perkin Elmer, Roissy, France) e diferentes oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1).

A busca por seqüências homólogas foi realizada no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se os programas BlastN e BlastP (Altschul et al., 1997). A tradução de seqüências foi realizada por meio do programa DNAMAN. Os alinhamentos de seqüências nucleotídicas e polipeptídicas foi possível com o auxílio do ClustalW (Thompson et al., 1994), sendo estas formatadas pelo programa BIOEDIT. Pesquisas por domínios conservados nas seqüências polipeptídicas foram realizadas pelo

programa InterProScan, disponibilizado pelo Instituto de Bioinformática Europeu - EBI (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). A localização celular de polipeptídeos foi inferida com o auxílio dos programas ProtComp6.1 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) e LOctree (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/loctree/query>). A predição de domínios transmembranas foi obtida, utilizando-se o programa TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em experimentos de seqüenciamento e RT-PCR.

Oligonucleotídeo	Matriz utilizada	Seqüência (5' →3')	Experimento
Olac1	pRescue2 pRescue7 pRescu16	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGC	Seqüenciamento
RTres2a	RNA	CGTGACGAAGACGGGGGTCCC	RT-PCR
RTres2b	RNA	GGGCCC GCCCGCCGTGGACCTTGA	RT-PCR
Res7.1	pRescue7	TCTTGTGGTTCTGGTATGCCCGGGAG	Seqüenciamento
Res7.2	pRescue7	AGGCGGGAATACGGGAACACGACC	Seqüenciamento
Res7.3	pRescue7	ACATCGCTACCCTGACGGGTCT	Seqüenciamento
Res7.4	pRescue7	TGCGAATCGGCCGATGCGCACG	Seqüenciamento
MSF1	RNA	CTTTGTTGCCCGGTTGTCTA	RT-PCR
MSF2	RNA	TATGCCCGGGAGAATAGGA	RT-PCR
Res16.1	pRescue16	GGCCTCGCGCTTCCCCTGGCCCTTT	Seqüenciamento
Res16.2	pRescue16	AGGAGCCGAATTCGTCGTTGTCTG	Seqüenciamento
RTRes16a	RNA	ACGACGGCCGCGAGCAGG	RT-PCR
RTRes16b	RNA	CAGGTTTCGTGCATCTCATGGACTG	RT-PCR
GPD1	RNA	CGCTGTGCGAGACCCCGACG	RT-PCR
GPD2	RNA	GCCTTGGCCTTGTCGATGGTGG	RT-PCR

3.8. Experimentos de RT-PCR

Para estudar a transcrição dos genes isolados durante o crescimento do fungo *in planta* e *in vitro*, foram realizados experimentos de RT-PCR. A primeira fita de cDNA e sua amplificação em moléculas de DNA foram obtidas com o Kit SuperScript™ II One-Step System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). As seqüências dos oligonucleotídeos, utilizados em cada experimento de RT-PCR, estão disponíveis na Tabela 1. Foram utilizados 100 ng de RNA total

como matriz, para a síntese do cDNA em todos os experimentos de RT-PCR. A síntese da primeira fita do cDNA dos genes *thfC1* e *gpd* foi feita a 55°C durante 30 min, seguida da sua amplificação de 30 ciclos com os seguintes passos: desnaturação à 94°C/15s, anelamento a 55°C/30s e polimerização a 68°C/30s. No final um passo de extensão a 68°C durante 5 min foi realizado. Para os genes *msfC1* e *plcC1* a primeira fita do cDNA foi sintetizada a 50°C e 58°C, respectivamente, durante 30 min, seguindo-se sua amplificação de 35 ciclos sob as mesmas condições utilizadas para *thfC1*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eficiência da transformação de *C. lindemuthianum*

As colônias transformadas de *C. lindemuthianum* LV49, resistentes à higromicina, foram observadas após 5 dias de inoculação. A sua contagem foi realizada durante cinco dias, após surgimento das primeiras colônias em meio seletivo, uma vez que o aparecimento destas não foi sincronizado. Três experimentos de transformação foram realizados e os resultados obtidos estão representados na Tabela 2. Apesar da variação no número de transformantes, foi observada a mesma tendência em todos os experimentos.

O estado físico do vetor pAN7.1 e a presença ou ausência de enzima de restrição na mistura de transformação influenciaram a eficiência da transformação em *C. lindemuthianum* LV49. A utilização do vetor pAN7.1 linear (tratamento L+IN) foi mais eficiente (~2,2x) do que a utilização do vetor circular. Apenas o estado físico do vetor deve ter influenciado a transformação, pois a enzima *NarI*, utilizada para a linearização do mesmo, foi inativada pelo calor antes do procedimento de transformação (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido por Redman et al. (1994) utilizando o vetor pHA1.3.

A eficiência do uso de vetores lineares durante a transformação é bem documentada, para diversos fungos filamentosos e leveduras como *Ustilago maydis*, *Agaricus bisporus*, *M. grisea* e *S. cerevisiae* (Wang et al., 1988; Shi et al., 1995; van de Rhee et al., 1996; Manivasakam et al., 1998; Marchi et al., 2006). Em *Cochliobolus heterostrophus*, o estado físico do vetor, utilizado na transformação, foi crucial e foram obtidos transformantes, apenas, quando o vetor foi usado na sua forma linear (Lu et al., 1994). Por outro lado, o número de transformantes de *Colletotrichum graminicola* não variou, utilizando-se o vetor circular ou linear, demonstrando que, neste organismo o estado físico do vetor não influencia a eficiência de transformação, embora o uso de enzima de restrição no momento da transformação tenha aumentado o número de transformantes obtidos (Thon et al., 2000). Em *Cercospora nicotianae*, o uso de vetor linear ou de enzima de restrição no procedimento de transformação decresceu a eficiência de transformação e não favoreceu integrações únicas (Chung et al., 2003).

A utilização de enzima de restrição, no momento da transformação, aumentou a obtenção de transformantes. Utilizando a enzima *NarI*, remanescente da reação de

hidrólise do pAN7.1 (tratamento L), foi obtido um aumento de 2,5X no número de transformantes, em relação ao tratamento L+IN, em que a mesma foi inativada termicamente. Quando 10U da mesma enzima foi acrescentada à mistura de transformação, esse aumento chegou a 4,5X (tratamento L+10U). Indiscutivelmente, a enzima de restrição *NarI* influenciou, diretamente, a eficiência em que o vetor pAN7.1 foi capaz de se integrar no genoma de *C. lindemuthianum* (Tabela 2).

Em muitos outros fungos, o uso de vetores lineares associados ao emprego de enzima de restrição no momento da transformação, aumentou a frequência de transformação (Lu et al., 1994; Shi et al., 1995; Akamatsu et al., 1997; Granado et al., 1997; Soares et al., 2000; Marchi et al., 2006). No presente estudo, o maior número de transformantes foi obtido utilizando-se o vetor pAN7.1 linearizado e acrescentando-se 10U da enzima *NarI* à mistura de transformação. O aumento de 10X foi obtido nesse tratamento em relação ao uso do vetor circular (Tabela 2). Esses resultados sugerem que a enzima de restrição está de alguma forma mediando o processo de transformação, característico do evento conhecido como REMI. Em eventos REMI, o mecanismo pelo qual a enzima de restrição media a integração do vetor ainda não é bem estabelecido. Entretanto, alguns autores supõem que a enzima de restrição causaria quebras na fita dupla de DNA no genoma do fungo gerando seqüências coesivas entre o terminal linear do vetor e do genoma. Essas regiões seriam reparadas pelo sistema de reparo de quebras duplas no DNA que, em leveduras, é conhecido como reparo por ligação de terminais não homólogos (Schiestl et al., 1991; Moore et al., 1996; Zhu & Schiestl, 1996; Manivasakam & Schiestl, 1998; Lewis et al, 1999).

A integração de vetores lineares, sem a presença de enzima, ocorreria por outro mecanismo de recombinação não homólogo, em que regiões de micro homologia dos terminais fita simples do vetor atuariam na integração. Enzimas como topoisomerase I podem estar envolvidas neste tipo de recombinação em *S. cerevisiae* (Zhu & Schiestl, 1996).

A quantidade de enzima de restrição necessária, para otimizar a eficiência de transformação, varia de acordo com a enzima escolhida. Thon et al. (2000), utilizando algumas enzimas de restrição na transformação de *C. graminicola*, observaram que *Hind* III e *Bam* HI foram as enzimas mais eficientes na obtenção de transformantes quando utilizou-se 60 e 20 unidades, respectivamente, no momento da transformação. A utilização da enzima *Hind* III na transformação de *C.*

lindemuthianum resultou num decréscimo do número de transformantes (Redman et al., 1994), diferentemente do que observamos nesse trabalho, onde foi utilizada a enzima *Nar I*.

Obviamente a atuação de enzima de restrição no genoma do organismo a ser transformado pode acarretar em eventos de mutação, tais como deleções e/ou rearranjos, que não sejam causados pela integração do vetor. Grandes deleções no DNA genômico podem ocorrer em procedimentos de transformação por REMI, dificultando a recuperação do gene inativado (Maier et al., 1999). Lewis et al. (1999) demonstraram que quando uma enzima de restrição é expressa na célula de leveduras acarreta a morte celular da mesma, possivelmente por causar inúmeras quebras duplas no genoma, que não podem ser reparadas eficientemente pelo sistema de reparo desse organismo. Mas a utilização de quantidades moderadas de enzimas de restrição na transformação de fungos parece não ter um efeito significativo na viabilidade dos protoplastos ou outros tipos de células utilizadas (Granado, 1997; Manivasakam et al., 1998; Thon et al., 2000).

As linhagens obtidas dos experimentos de transformação foram posteriormente testadas em plantas de feijoeiro para a detecção de possíveis mutantes na patogenicidade ou virulência. Foram testadas inicialmente as linhagens obtidas nos tratamentos L+IN e L (Tabela 2), nos quais se utilizou menor quantidade de enzima de restrição, minimizando a probabilidade de selecionar possíveis mutantes gerados a partir de deleções e/ou rearranjos.

TABELA 2. Eficiência de transformação em *C. lindemuthianum* utilizando-se o vetor pAN7.1 em diferentes estados físicos, na ausência ou presença de enzima de restrição.

EXPERIMENTO	C^(a)	L+IN^(b)	L^(c)	L +2U NarI^(d)	L + 10U Nar I^(e)
A	91	164	373	280	680
B	54	100	315	262	500
C	35	nd ^(f)	295	190	602
Média	60	132	327,6	244	594
EFICIÊNCIA^(g)	12	26,4	65,6	48,8	118,8

Resultado de três experimentos independentes. (a) pAN7.1 circular; (b) pAN7.1 linearizado com *Nar I*, e posterior inativação térmica da enzima; (c) pAN7.1 linearizado com *Nar I*, e sem inativação térmica da enzima; (d) e (e) pAN7.1 linearizado com *Nar I*, sem inativação térmica da enzima, mais adição de 2U e 10U de *Nar I*, respectivamente, no momento do protocolo de transformação; (f) número de transformantes não determinado; (g) número de transformantes/ μg de pAN7.1/ 10^7 protoplastos.

4.2. Detecção de linhagens mutantes

A maioria dos transformantes inoculados em folhas excisadas não apresentou diferença na expressão dos sintomas da antracnose, em comparação com os causados pela linhagem selvagem LV49.

Do total de 580 transformantes testados, foram isoladas três linhagens mutantes, resultando numa taxa de mutantes de 0,5%. Dufresce et al. (1998), utilizando a mesma técnica de seleção de mutantes para *C. lindemuthianum*, obteve aproximadamente 0,6% de linhagens mutantes. Em *M. grisea*, a porcentagem relatada para obtenção de mutantes deficientes na infecção do hospedeiro tem sido 0,49% (Sweigard et al., 1998), sendo que, em *U. maydis* esse valor chega a 1,4% dos transformantes testados (Bölker et al., 1995).

A técnica de mutagênese insercional, utilizando plasmídeo ou T-DNA, foi eficiente para obtenção de linhagens com alteração na patogenicidade em diversos fungos, possibilitando o isolamento de diferentes genes, tais como *AMY1* no patógeno humano *Histoplasma capsulatum* (Marion et al., 2006), assim como *FRP1* de *F. oxysporum* (Duyvesteijn et al., 2005), *MGG1* de *M. grisea* (Shen et al., 2006), *APH1* de *C. lagenarium* (Takano et al., 2006) e diferentes genes no gênero *Colletotrichum* (Thon et al., 2000; Dufresne et al., 1998, 2000; Parisot et al., 2002).

Os fenótipos mutantes desses três transformantes nomeados mut5, mut29 e mut65 foram confirmados, por meio de três testes independentes em folhas excisadas. Além dos testes de patogenicidade, o comportamento dessas três linhagens mutantes em cultura axênica foi comparado ao da linhagem selvagem LV49. Foram avaliados o crescimento radial e a esporulação. Nenhuma diferença significativa foi evidenciada entre os mutantes e o isolado selvagem.

O isolado selvagem LV49 produziu os sintomas macroscópicos típicos da antracnose nas folhas excisadas de feijoeiro. As primeiras lesões de cor marrom surgiram nas nervuras primárias, 4 a 5 dias após inoculação. A área de tecido vegetal atingida por essas lesões atingiu, durante as 48 h seguintes, as nervuras secundárias alcançando, praticamente, todo o limbo da folha. Neste estágio, o tecido foliar sofreu intensa maceração (Figura 1A).

Sob as mesmas condições de incubação, a linhagem mut5 ocasionou raros e pequenos pontos escuros na nervura principal, após cinco dias de inoculação nas folhas excisadas (Figura 1D e E). No entanto, essas pequenas lesões não evoluíram

em extensão da área afetada, mesmo após os sete dias de incubação, quando foi evidente a maceração, ocasionada pela linhagem selvagem.

As linhagens mut65 e mut29 produziram manchas escuras na nervura principal, após cinco dias e outras de menor extensão nas nervuras secundárias. Entretanto, em nenhum desses dois mutantes testados, sobre folhas excisadas, as lesões ocasionaram a maceração do tecido, como ocorreu na linhagem selvagem após sete dias de inoculação (Figura 1E a I).

Quando os conídios do isolado selvagem LV49 foram inoculados em plantas, os sintomas típicos também surgiram quatro a cinco dias após a inoculação. Aos sete dias, as manchas marrons atingiram as nervuras principal e secundária, além de áreas do limbo. Sobre as áreas lesionadas, presentes nas nervuras, acumulou-se uma secreção líquida de cor marrom. Por fim, a planta morreu devido à maceração do tecido vegetal. Esta fase coincide com a produção de um conjunto de enzimas hidrolíticas da parede celular do hospedeiro (Wijesundera et al., 1989; Knogge, 1998).

A inoculação de conídios do mut5 em plantas de feijoeiro resultou no aparecimento de pequenas lesões, nas nervuras primárias das folhas. Consequentemente, a planta não sofreu maceração e manteve-se viva, mesmo após sete dias de inoculação dos conídios. Por esta razão, essa linhagem foi considerada não patogênica.

No caso das linhagens mut65 e mut29, as lesões macroscópicas, que surgiram após cinco dias, na nervura principal, estenderam-se para as nervuras secundárias após sete dias de inoculação. Sobre essas lesões, acumulou-se um líquido de cor marrom, assim como observado nas plântulas inoculadas com o isolado selvagem LV49. As plantas mantiveram-se vivas e sofreram pouca maceração, mesmo após nove dias de inoculação (dados não mostrados). Devido a estes fatores, os dois mutantes foram considerados patogênicos, mas com menor virulência.

A técnica de seleção de mutantes, em folhas excisadas, demonstrou ser rápida e eficiente. Os resultados, obtidos nas folhas excisadas, foram semelhantes àqueles dos testes em plantas de feijoeiro.

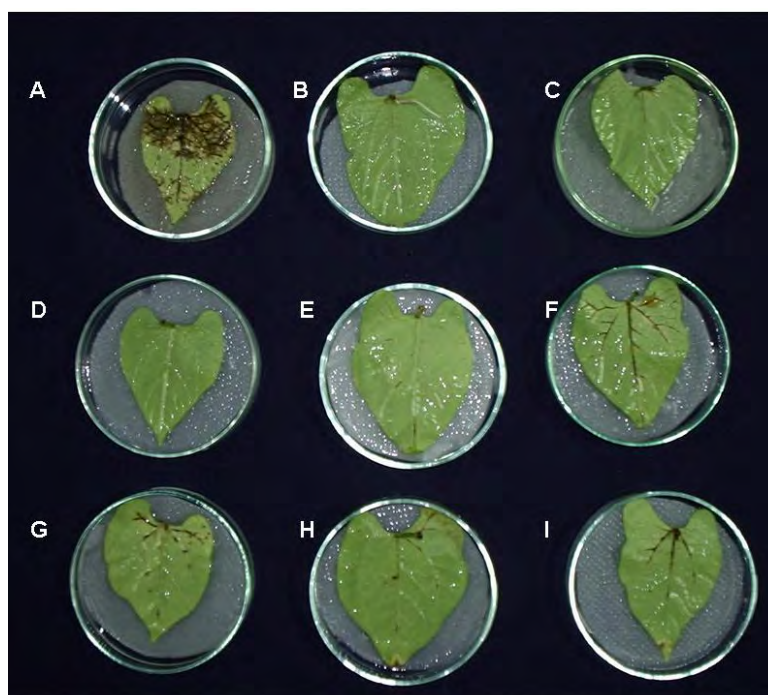


Figura 1. Teste de patogenicidade das linhagens selvagem e dos mutantes mut5, mut65 e mut29 em folhas excisadas de *Phaseolus vulgaris*, da cultivar susceptível Rosinha. Folhas excisadas foram pulverizadas com água (B e C) ou com a suspensão de conídios das linhagens: LV49 (A), mut5 (D e E), mut 29 (F e G) e mut65 (H e I). A foto foi realizada aos 7 dias após a inoculação.

4.3 . Cinética da infecção dos mutantes mut5, mut29 e mut65 em hipocótilos excisados de plantas de feijoeiro

Foi investigado, por meio de microscopia de fluorescência, o fenótipo dos mutantes ao longo da infecção do tecido vegetal. Os conídios, do isolado selvagem LV49 e dos mutantes, foram inoculados em hipocótilos de feijoeiro susceptível à antracnose. Dois e sete dias após a inoculação foram feitos cortes e a coloração dos tecidos para observação dos estágios da colonização.

Observa-se conídios germinados dois dias após inoculação da cultivar susceptível Rosinha. Além disso, distinguem-se tubos germinativos crescendo sobre a camada de cutícula do tecido vegetal e a diferenciação de apressórios marrons devido à produção e acúmulo de melanina (Figura 2A e B). A formação dessa estrutura é necessária para a penetração na célula epidermal para o desenvolvimento das hifas primárias, a partir da vesícula de infecção (O'Connell et al., 1985). Não foi possível a observação dessa vesícula, mas as hifas primárias foram bem evidentes 2 dias após inoculação (Figura 2C e D). Nota-se que estas hifas são de espessura grossa

e pouco ramificadas. O crescimento dessa hifa ocorre intracelularmente entre a parede celular e a membrana plasmática vegetal. Pode-se inclusive notar a constrição da hifa quando esta atravessa a parede celular vegetal de uma célula para outra (Figura 2C). Essa é a fase de nutrição fúngica conhecida como biotrófica, pois nesse período, *C. lindemuthianum* obtém seus nutrientes do tecido vegetal sem ocasionar a morte celular, mantendo-as vivas (O'Connell et al., 1985).

Após sete dias de inoculação, os sintomas macroscópicos da antracnose foram observados, caracterizado pela maceração do tecido vegetal. Microscopicamente, essa fase é caracterizada pela presença de hifas secundárias, mais finas e ramificadas em relação às hifas primárias (Figura 2 E a H). Mesmo aos dois dias de inoculação, o início da diferenciação das hifas secundárias, a partir das hifas primárias, é observado (Figura 2D). As hifas secundárias produzem um arsenal enzimático capaz de degradar a parede celular vegetal, ocasionando a morte das mesmas, correlacionando, macroscopicamente, com a maceração do tecido vegetal. O fungo *C. lindemuthianum* absorve nutrientes gerados dessa maceração, o que caracteriza a fase necrotrófica da patogênese.

Na fase necrotrófica, o ciclo de vida assexuado do *C. lindemuthianum* é concluído com a diferenciação do acérvulo (Figura 2 G e H). Esta estrutura é formada por um conjunto de hifas subepidérmicas e subcuticulares no tecido vegetal hospedeiro. No estágio final de sua diferenciação, ocorre a formação de conidióforos e conídios, ocasionando o rompimento da epiderme vegetal.

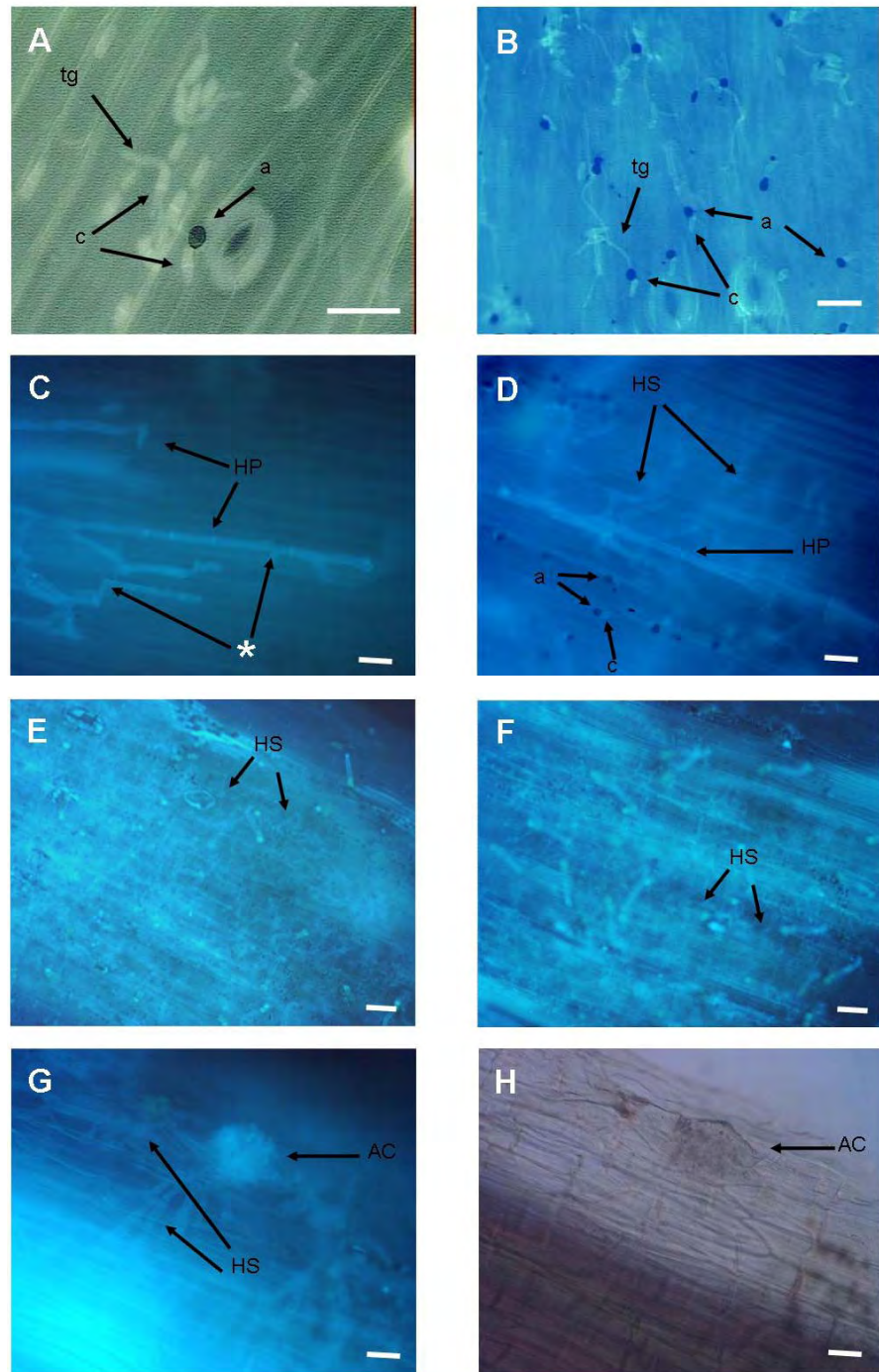


Figura 2. Análise citológica do isolado LV49 aos 2 (A a D) e 7 (E a H) dias após a inoculação de hypocótilos excisados de feijoeiro. Conídios foram inoculados em hypocótilos, e amostras foram coradas com azul de anilina. (c) conídio, (a) apressório, (tg) tubo germinativo, (HP) hifa primária, (HS) hifa secundária, (AC) acérvulo. Barra de escala representa 25 μ m. G e H representam o mesmo campo observado com e sem fluorescência, respectivamente. * representa constrição da hifa primária ao passar de uma célula vegetal à outra.

4.3.1. Cinética da infecção da linhagem mutante mut5

Conforme discutido anteriormente, a inoculação da linhagem mut5 nas folhas excisadas da cultivar susceptível Rosinha resultou em raras e pequenas manchas marrons na nervura principal (Figura 1 D-E).

O desenvolvimento dessa linhagem no tecido vegetal foi acompanhado citologicamente. Observou-se que os conídios do mutante mut5 foram capazes de germinar, emitir tubos germinativos, bem como desenvolver apressórios melanizados após dois dias de inoculação de hipocótilos (Figura 3, A-D).

Além da observação de um número menor de apressórios diferenciados, também não foi observado infecção no tecido vegetal em comparação ao desenvolvimento de hifas secundárias observado no isolado selvagem (Figura 2D). Portanto, o mutante mut5 teve um retardo na germinação, diferenciação do apressório e penetração do tecido vegetal em relação à linhagem selvagem.

Um maior número de conídios diferenciou apressórios somente após 7 dias de inoculação (Figura 3G). Raramente, foi encontrada a formação de hifas primárias que caracteriza a penetração do tecido vegetal (Figura 3H). A maioria dos conídios germinados desenvolveu hifas vegetativas, que cresceram superficialmente no tecido vegetal (Figura 3, E, F-G), ao invés de diferenciar apressórios e, em seguida, penetrar no tecido hospedeiro. As hifas secundárias, típicas da fase necrotrófica, não foram observadas, correlacionando com um menor número de lesões macroscópicas.

As hifas vegetativas diferenciadas na superfície do tecido foliar foram capazes de formar conidióforos que produziram conídios (Figura 3, E e F). Os nutrientes utilizados por essas hifas, provavelmente vieram das reservas estocadas nos próprios conídios e de possíveis nutrientes presentes na superfície da cutícula.

O isolado selvagem LV49 também diferenciou conidióforos, após sete dias de inoculação, mas essas estruturas reprodutivas desenvolveram-se a partir de hifas secundárias, resultando no acérvulo.

Portanto, o mutante mut5 é bloqueado na fase de penetração, não pela incapacidade de desenvolver um apressório, mas, possivelmente, por esse não ser funcional ou devido à incapacidade de diferenciação das hifas primárias. Esta linhagem comportou-se de forma saprofítica, obtendo nutrientes armazenados no conídio e, ou da superfície da planta para germinar, lançar hifas vegetativas, e fechar seu ciclo assexuado, diferenciando conidióforos produtores de conídios. Tanto o

mutante mut65 quanto o mut29 foram incapazes de diferenciar conidióforos na superfície do tecido vegetal.

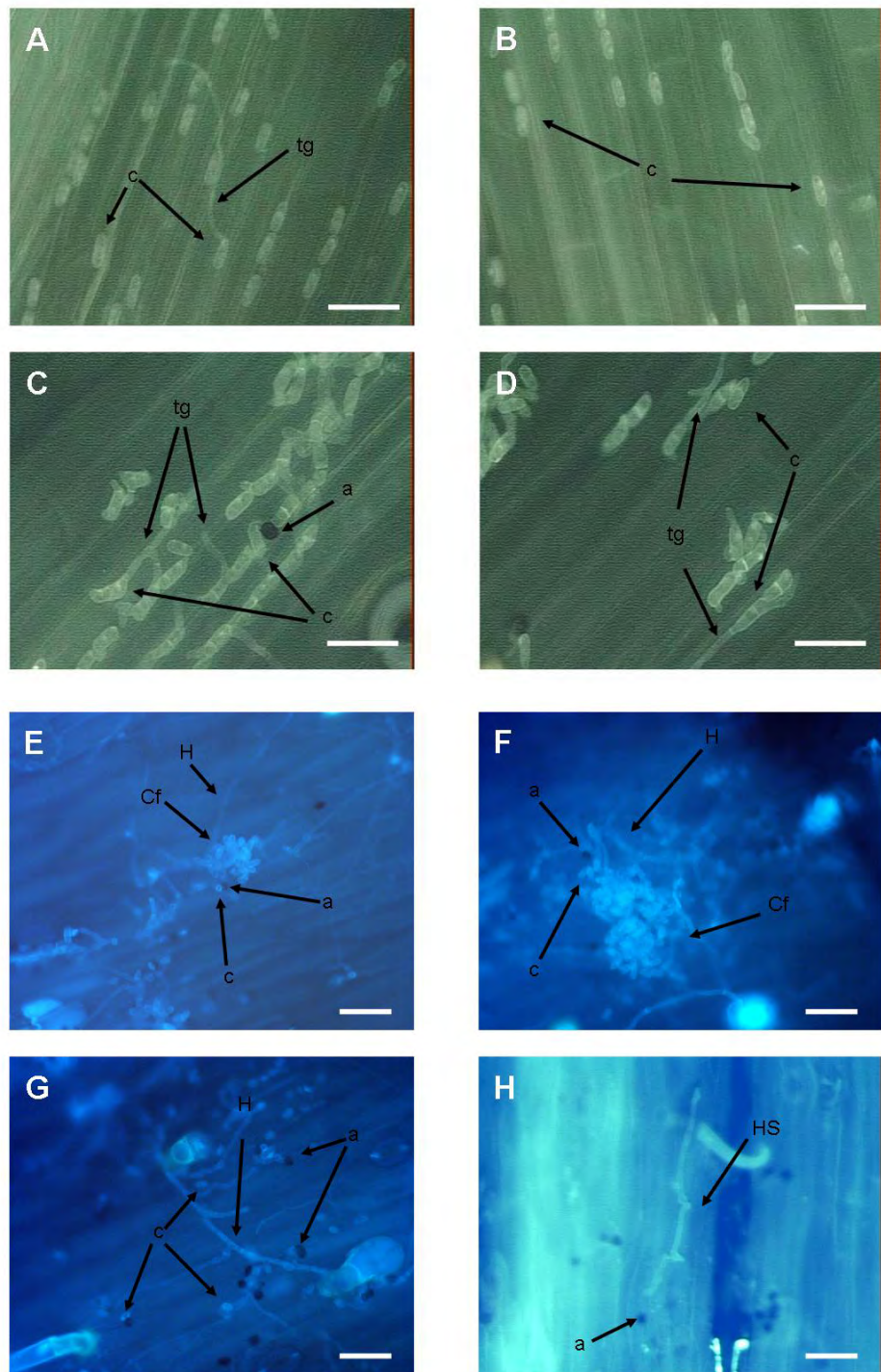


Figura 3. Análise citológica da linhagem mutante *mut5* aos 2 (A a D) e 7 (E a H) dias após inoculação de hypocótilos excisados de feijoeiro. Conídios foram inoculados em hypocótilos, e amostras foram coradas com azul de anilina. (c) conídio, (a) apressório, (tg) tubo germinativo, (H) hifa vegetativa, (Cf) conidióforo. Barra de escala representa 25 μ m.

4.3.2. Cinética da infecção da linhagem mutante mut29

A maioria dos conídios do mutante mut29 germinaram dois dias após inoculação no hipocótilo da cultivar susceptível Rosinha. Não foram observados conídios pelo mutante mut29 e, conseqüentemente, nenhuma hifa secundária (Figura 4, A-D).

Os tubos germinativos, lançados pelos conídios do mutante mut29, rapidamente ramificaram-se em hifas; apresentando um padrão bem diferente do observado durante a germinação dos conídios do isolado LV49, no qual a partir dos tubos germinativos não ramificados ocorreu a diferenciação do apressório (Figura 2A), em acordo com a descrição de O'Connell et al. (1985). Além da rápida ramificação do tubo germinativo a partir de um mesmo conídio, observou-se o desenvolvimento de várias dessas estruturas (Figura 4A). Este padrão de germinação foi exclusivo do mutante mut29.

A formação de apressórios foi observada somente, após sete dias de inoculação e em menor número em relação à linhagem selvagem (Figura 4, E a H). Dentre os três mutantes isolados neste trabalho, o mutante mut29 foi o único no qual a diferenciação de apressórios ocorreu apenas cinco dias após a inoculação. Não foi possível detectar hifas primárias, o que caracteriza a penetração de *C. lindemuthianum* no tecido vegetal. Isso leva a crer que este mutante é bloqueado na fase entre a diferenciação do apressório e a penetração.

Este mutante não tem o mesmo comportamento saprofítico apresentado pelo mut5. Ele não foi capaz de fechar o ciclo de vida assexual sobre o tecido vegetal, com o desenvolvimento de conidióforos maduros produzindo conídios, pelo menos dentro do período de tempo avaliado.

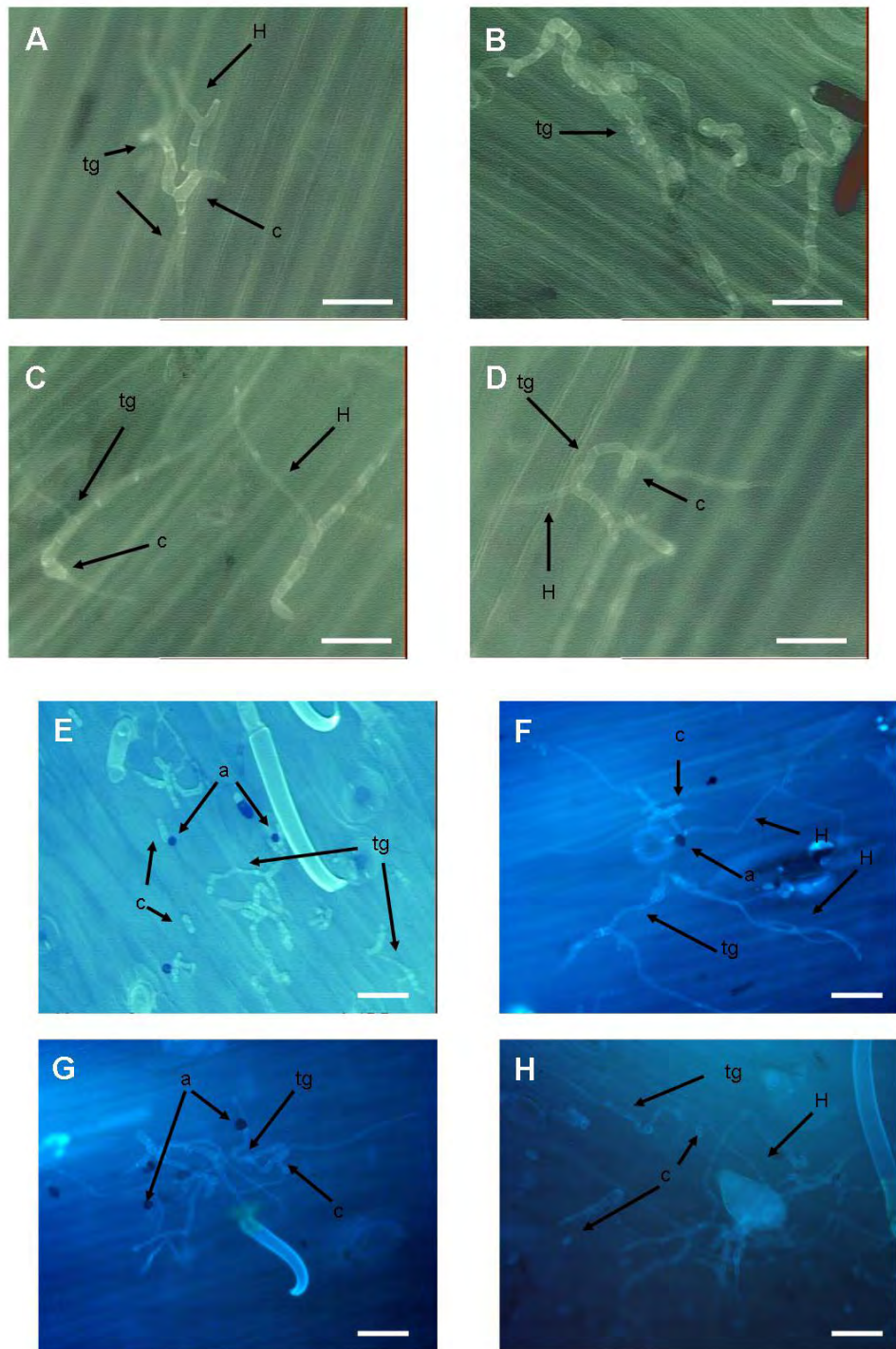


Figura 4. Análise citológica do mutante mut29, 2 (A a D) e 7 (E a H) dias após inoculação de hipocótilos excisados de feijoeiro. Conídios foram inoculados em hipocótilos, e amostras foram coradas com azul de anilina. (c) conídio, (a) apressório, (tg) tubo germinativo, (H) hifa vegetativa. Barra de escala representa 25 μ m.

4.3.3. Cinética da infecção da linhagem mutante mut65

Os conídios da linhagem mut65, assim como do isolado selvagem LV49, foram capazes de formar tubos germinativos e apressórios melanizados após dois dias de inoculação (Figura 5, A-B). Neste mutante, assim como LV49 e mut5, cada conídio desenvolveu apenas um tubo germinativo (Figura 5A), diferente do observado no mut29. Não foram detectadas hifas primárias no tecido hospedeiro nesse período, o que indica que este mutante não foi capaz de penetrar nas células do tecido vegetal. Mesmo após sete dias de inoculação, hifas primárias ou secundárias não foram observadas. Entretanto, o número de apressórios diferenciados aumentou, com alguns conídios apresentando tubos germinativos longos (Figura 5, C-D).

Esta linhagem, assim como o mut29, não foi capaz de fechar seu ciclo de vida assexuado no tecido vegetal, como observado na linhagem mut5. Isto reforça a idéia de que a capacidade de crescimento saprofítico foi ocasionada por alguma mutação presente, apenas, no mut5. Assim como no mutante mut29, o mutante mut65 não foi capaz de penetrar no tecido do hipocótilo, devido à ausência de hifas primárias, características de uma colonização biotrófica.

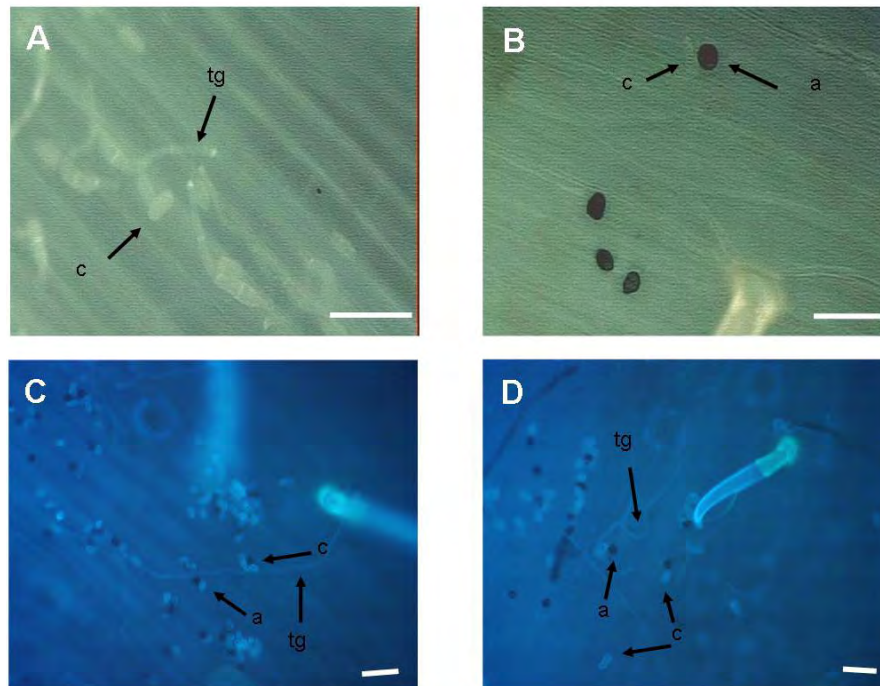


Figura 5. Estudo citológico da linhagem mutante mut65, 2 (A e B) e 7 (C e D) dias após inoculação. Conídios foram inoculados em hipocótilos, e amostras foram coradas com azul de anilina. (c) conídio, (a) apreensório, (tg) tubo germinativo. Barra de escala representa 25 μ m.

4.3.4. Sintomas macroscópicos x microscópicos

Após 7 dias de inoculação, o isolado selvagem LV49 desenvolveu manchas marrons macroscópicas sobre as nervuras das folhas excisadas de feijoeiro (Figura 1A). O aparecimento macroscópico dessas lesões coincidiu com o estabelecimento necrotrófico de *C. lindemuthianum* pela diferenciação de suas hifas secundárias (Figura 2, E-F) (O'Connell et. al., 1985).

É interessante notar que os mutantes mut5, mut29 e mut65 foram capazes de causar lesões marrons macroscópicas nas folhas excisadas, mas não formaram as hifas secundárias no tecido vegetal, conforme discutido anteriormente.

Esta diferença pode ter sido causada pela utilização de diferentes órgãos vegetais do feijoeiro nos experimentos. Para as observações macroscópicas, foram utilizadas folhas excisadas, enquanto, para as observações citológicas, utilizou-se o hipocótilo excisado. Dufresne & Osbourn (2001) relatam que alguns mutantes não-patogênicos de *M. grisea* exibiram especificidade em relação a parte da planta testada, haja visto que uma mesma linhagem transformante pode comporta-se como mutante ou como tipo selvagem. Outro trabalho também relaciona este mesmo fenótipo em *C. lindemuthianum*, sendo que as lesões causadas no feijoeiro pelo mutante *clnr1* variaram de acordo a parte da planta inoculada (Pellier et al., 2003).

4.4. Recuperação do plasmídeo das linhagens mutantes

Para identificar os genes interrompidos, que possivelmente foram responsáveis pelos fenótipos mutantes, foi utilizada a estratégia de recuperação dos plasmídeos integrados no genoma dos transformantes. Com esta estratégia, além de recuperar o plasmídeo, é possível obter também seqüências adjacentes ao sítio de integração, que correspondem ao gene mutado.

O DNA total dos mutantes mut5, mut29 e mut65 foi clivado com as enzimas de restrição *KpnI* ou *HindIII*. Os fragmentos totais, obtidos nesta clivagem, foram circularizados com a enzima T4 DNA ligase, e este DNA foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli*. Colônias de bactérias transformantes surgiram em meio LB+ampicilina, somente quando o DNA total das linhagens mut29 e mut65 foram digeridos com *HindIII*.

Todos os plasmídeos recuperados foram clivados com a mesma enzima de restrição utilizada no procedimento de recuperação. Dessa forma, eliminou-se os plasmídeos que possuíam mais de um fragmento ligado, sendo escolhidos aqueles originados da circularização de apenas um fragmento. A maioria dos plasmídeos recuperados originou-se da circularização de apenas um fragmento.

A partir da linhagem mut29, foram recuperados os plasmídeos nomeados pRescue7 e pRescue16, enquanto o plasmídeo pRescue2 foi obtido da linhagem mut65. Todos esses plasmídeos foram maiores que o vetor pAN7.1, indicando que eles carregavam alguma seqüência de *C. lindemuthianum*. Não foram recuperados plasmídeos da linhagem mut5.

Quando pAN7.1 sofre clivagem dupla *XbaI/ScaI*, são gerados 4 fragmentos com os respectivos tamanhos de 3900, 1080, 910 e 800 pb. A análise de restrição dos plasmídeos pRescue2, pRescue7 e pRescue16, clivados com *XbaI/ScaI*, sugere que o fragmento de 910 pb do pAN7.1 está ligado à seqüência de DNA pertencente ao *C. lindemuthianum*, sendo que os outros fragmentos gerados são do tamanho esperado para o pAN7.1 (Figura 6). O resultado de restrição sugere que a integração do vetor, durante a mutagênese insercional, pode ter ocorrido via extremidades do vetor linearizado com *NarI*, pois, o sítio de restrição para esta enzima está contido, justamente, no fragmento de 910pb do pAN7.1.

Não foi possível realizar a subclonagem das seqüências fúngicas presentes nos plasmídeos recuperados. Dessa forma, para obtenção das seqüências dos genes interrompidos pela inserção do pAN7.1, os plasmídeos recuperados foram

seqüenciados diretamente a partir do oligonucleotídio Olac1 (Tabela 1), que anela próximo ao sítio de clivagem *NarI*.

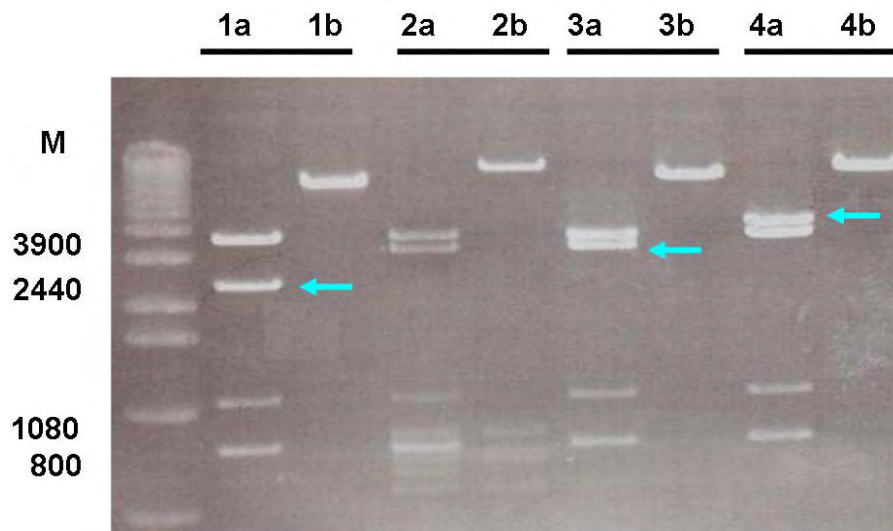


Figura 6. Análise de restrição de alguns plasmídeos recuperados a partir de linhagens mutantes. M – Marcador de tamanho; Canaletas identificadas como 1, 2, 3 e 4 são os plasmídeos pRescue16, pRescue5, pRescue7 e pRescue2 respectivamente, clivados com a enzima *XbaI* (a) ou *XbaI/ScaI* (b). Setas indicam o fragmento de DNA contendo seqüência de origem fúngica.

4.4.1. Plasmídeo pRescue2 do mutante mut65

O plasmídeo pRescue2 foi recuperado do DNA genômico da linhagem mutante mut65 (Figura 7). Durante o procedimento de recuperação, foram obtidas colônias de bactérias transformantes apenas quando foi usada a enzima *HindIII*, que cliva em apenas um sítio no vetor pAN7.1. Dessa forma, foi recuperada apenas uma região do DNA fúngico que flanqueia o pAN7.1.

Pela análise de restrição, o fragmento gerado pela digestão dupla com *XbaI/ScaI* gera um fragmento de aproximadamente de 4000 pb, contendo parte da seqüência do pAN7.1 e do DNA genômico do *C. lindemuthianum* interrompido pela mutagênese (Figura 6).

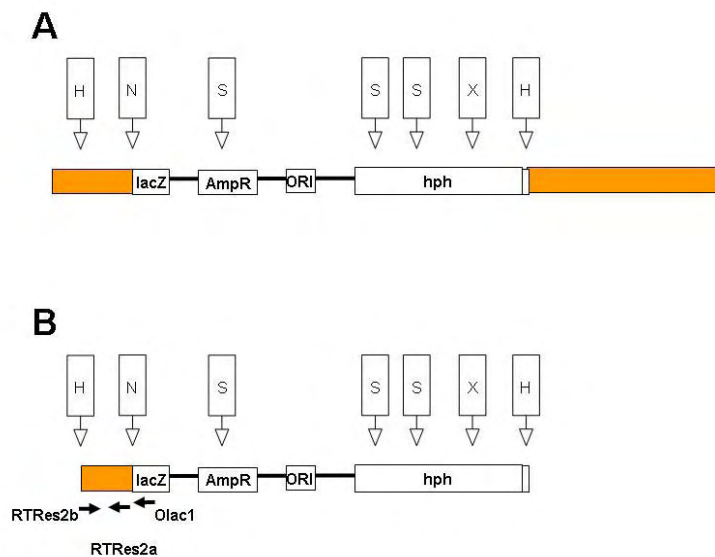


Figura 7. Esquema de inserção do pAN7.1 no genoma do mut65 (A) e mapa parcial de restrição do plasmídeo pRescue2 (B) obtido a partir da linhagem mutante mut65. Retângulos cinzas representam a seqüência do DNA genômico do *C. lindemuthianum*, interrompida pelo pAN7.1, e os retângulos claros representam genes presentes no vetor pAN7.1. *HindIII* (H), *NarI* (N), *ScaI* (S) e *XbaI* (X). Seta indica o oligonucleotídeo Olac1 utilizado no seqüenciamento, e os oligonucleotídeos RTRes2a e RTRes2b usados no RT-PCR.

O oligonucleotídeo Olac1, obtido a partir da seqüência do pAN7.1 na região do gene lacZ, foi utilizado para iniciar o seqüenciamento do fragmento do DNA fúngico. Foi obtida uma seqüência de 493 pb, após retirada de regiões pertencentes ao vetor pAN7.1.

Não foi detectado o sítio de restrição para *NarI* no local de ligação entre a extremidade do pAN7.1 e a seqüência flanqueadora analisada (Figura 8). O sítio de

clivagem desta enzima é 5'GGCGCC3' e a seqüência no local de ligação é 5'TGCGCC3'. Portanto, na extremidade analisada, não houve um evento REMI perfeito. Provavelmente, houve uma mutação durante o processo de ligação dos terminais livres do DNA genômico e do plasmídeo.

A utilização de enzima de restrição, no momento da transformação, nem sempre resulta na regeneração do sítio da enzima no momento da integração do vetor no genoma. Nesse caso, é provável que a integração não tenha sido direcionada no sítio da enzima ou, então, que a integração seja direcionada, mas o sítio de restrição da enzima não pode ser regenerado por erros no sistema de reparo.

Na pesquisa realizada via Blast, demonstrou-se que a seqüência de 493 pb codifica parte de uma proteína com alta homologia a proteínas de função ainda desconhecida e a enzima Tetrahydrofolato Sintase (THS) de vários fungos filamentosos (Tabela 3). O alinhamento desses 164 aminoácidos, obtido pelo programa ClustalX, com proteínas de fungos filamentosos demonstrou que esta região é, altamente, conservada nesses organismos (Figura 10).

A seqüência polipeptídica parcial, obtida a partir do pRescue2, contém parte do domínio catalítico (FTHFS) formato:tetrahydrofolato ligase, de acordo com a pesquisa de domínios feita no InterProScan (EMBL-EBI) (Figura 10). Este domínio é responsável pela primeira reação do metabolismo de um carbono, capaz de transferir uma unidade de carbono do formato para o tetrahydrofolato, às custas de um ATP, gerando o 10-formiltetrahydrofolato. Dessa forma, esta seqüência foi nomeada como tetrahydrofolato sintase de *C. lindemuthianum* (*thsCl*).

A enzima C1-tetrahydrofolato sintase (C1-THF sintase) ou ligase formato-tetrahydrofolato de eucariotos é uma das enzimas que participa na transferência de unidades de um carbono em várias vias metabólicas importantes. Em eucariotos, ela é constituída por dois polipeptídeos idênticos, formando uma proteína dimérica na qual cada polipeptídeo é trifuncional; apresentando as seguintes funções enzimáticas: formato:tetrahydrofolato ligase (EC 6.3.4.3), 5,10-meteniltetrahydrofolato 5-hidrolase (EC 3.5.4.9) e 5,10-metilenotetrahydrofolato:NADP⁺ oxidoreductase (EC 1.5.1.5). Esse polipeptídeo trifuncional catalisa três reações químicas seqüenciais (Shannon & Rabinowitz, 1988; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>).

Em *S. cerevisiae*, assim como em humanos, existem duas isoformas da C1-THF sintase, sendo uma localizada na mitocôndria e a outra no citoplasma (Shannon & Rabinowitz, 1988; Sugiura et al., 2004). A deleção do MIS1, gene codificador da

C1-THF sintase mitocondrial, não tem efeito detectável no crescimento de *S. cerevisiae* (Shannon et al, 1988). Em humanos, o gene que codifica para a proteína mitocondrial, mtC₁-THFS, sofre um aumento da expressão em tecido coloretal cancerígeno, levando a crer que esse gene possa participar na progressão desse tipo de câncer (Sugiura et al., 2004).

A provável proteína ThfCl de *C. lindemuthianum* possivelmente é uma isoforma presente no citoplasma. Esse resultado foi obtido após a análise da sua seqüência primária obtida pelos programas ProtComp6.1 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) e LOctree (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/loctree/query>), capazes de predizerem a localização celular de diversas proteínas em animais e fungos.

A integração do vetor pAN7.1, interrompendo o gene putativo *thfCl* de *C. lindemuthianum*, no mutante mut65 não é letal, visto que este mutante é capaz de crescer *in vitro* e não apresenta alteração detectável no seu crescimento.

Como o mutante apresenta redução na virulência, quando testada em folhas excisadas de feijoeiro, pode ser inferido que o gene *thfCl* é um gene candidato a fator de virulência em *C. lindemuthianum*. Para a confirmação dessa hipótese, é necessário verificar se o fenótipo observado nesse mutante correlaciona-se com a interrupção desse gene ou se foi originado por outro evento de mutação. A complementação da linhagem mutante com o gene *thfCl* funcional e, ou mutagênese direcionada para esse locus são estratégias que deverão ser realizadas a fim de determinar o real papel dessa proteína na patogênese.

1									TTT	TCA	AAT	TTC	GTT	GCC	AGG	GAG	45																									
1									F	S	N	F	V	A	R	E	088																									
46	TGC	ATG	GCC	ATC	TTC	GCC	TTC	AGC	ACC	GAC	TTG	GCC	GAC	ATG	CGC	90																										
09	C	M	A	I	F	A	F	S	T	D	L	A	D	M	R	23																										
91	GAG	CGC	CTC	GGC	CGG	CAT	GTT	GTC	GCC	AGC	TCC	AGG	AGC	GGC	GAC	135																										
24	E	R	L	G	R	H	V	V	A	S	S	R	S	G	D	38																										
136	CCC	GTC	ACC	TGG	GAA	GAC	ATT	GGC	GCG	GGC	GGC	GCC	CTG	ACC	GCG	180																										
39	P	V	T	W	E	D	I	G	A	G	G	A	L	T	A	53																										
181	CTG	ATG	AGG	GAC	GCC	ATC	AAG	CCC	AAC	CTG	ATG	CAG	ACG	CTC	GAG	225																										
54	L	M	R	D	A	I	K	P	N	L	M	Q	T	L	E	68																										
226	GGA	ACC	CCC	GTC	TTC	GTG	CAC	GCG	GGC	CCC	TTT	GCC	AAC	ATC	AGC	270																										
69	G	T	P	V	F	V	H	A	G	P	F	A	N	I	S	83																										
271	GTC	GGC	AAC	AGC	TCC	ATC	CTG	GCC	GAC	AAG	ATG	GCC	CTC	AAG	ATC	315																										
84	V	G	N	S	S	I	L	A	D	K	M	A	L	K	I	98																										
316	GTG	GGC	ACC	GAG	CCC	GAC	GAG	GAC	CAC	GCC	GAC	AAG	GCC	GGC	TTC	360																										
99	V	G	T	E	P	D	E	D	H	A	D	K	A	G	F	113																										
361	GTC	GTC	ACC	GAG	GCC	GGC	TTC	GAC	TTC	ACC	ATG	GGC	GGC	GAG	CGT	405																										
114	V	V	T	E	A	G	F	D	F	T	M	G	G	E	R	128																										
406	TTC	TTC	AAC	ATC	AAG	TGC	CGC	GCC	TCG	GGC	CTC	GTC	CCG	GAC	GTC	450																										
129	F	F	N	I	K	C	R	A	S	G	L	V	P	D	V	143																										
451	GTC	GTC	ATC	GTC	GCG	ACC	GTC	CGC	GCC	CTC	AAG	GTC	CAC	GGC	GGC	495																										
144	V	V	I	V	A	T	V	R	A	L	K	V	H	G	G	158																										
496	GGG	CCC	CTC	CAT	CGC	CCC	CGGCGCA	a	t	c	t	g	c	t	c	t	g	a	t	g	c	c	g	c	a	540																
159	G	P	L	H	R	P																																				
541	g	t	t	a	a	g	c	c	a	g	c	c	c	c	g	a	c	c	c	c	g	a	c	c	c	c	c	g	t	g	a	c	g	c	g	c	c	t	g	585		
586	a	c	g	g	g	c	t	t	g	t	c	t	g	c	t	c	c	g	c	a	t	c	c	g	t	t	a	c	a	g	a	c	a	a	g	c	t	g	t	g	a	630
631	c	g	t	c	c	c	g	g	a	g	c	t	g	c	a	t	g	t	c	a	g	a	g	g	t	a	a	c	c	g	t	c	a	t	c	a	c	c	g	a	675	
676	a	a	c	g	c	g	c	g	a	t	c	c	g	c	t	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	705	

Figura 8. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos obtida pelo seqüenciamento do pRescue2. Regiões marcadas em cinza representam local de anelamento dos oligonucleotídeos RTRes2b e RTRes2a; letras minúsculas representam seqüência do pAN7.1; e a região sublinhada demonstra o local de ligação entre o vetor e o DNA genômico do *C. lindemuthianum*.

Tabela 3. Grau de similaridade e identidade da sequência de 164 aa, obtida a partir da sequência do plasmídeo pRescue2, com diversas sequências de proteínas fúngicas.

PROTEÍNA	ORGANISMO	IDENTIDADE (%)	SIMILARIDADE (%)
Proteína hipotética	<i>Magnaporthe grisea</i> (XP_368230)*	85	89
Proteína hipotética	<i>N. crassa</i> (XP_956550)	83	89
Proteína hipotética	<i>Chaetomium globosum</i> (XP_001226602)	84	89
Proteína hipotética	<i>Coccidioides immitis</i> (XP_001240508)	81	89
Proteína hipotética	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (EAT91241)	81	90
Proteína hipotética	<i>Gibberella zeae</i> (XP_390443)	83	88
C1-tetrahydrofolato sintase (THFS)	<i>Leptosphaeria maculans</i> (AAM92144)	82	90
C1-THFS	<i>Aspergillus fumigatus</i> (XP_754750)	79	85
Putativa C1 THFS	<i>Neosartorya fischeri</i> (XP_001263575)	79	85
C1-THFS	<i>Aspergillus nidulans</i> (AAK76729)	78	87
Precursor mitocondrial C1 THFS	<i>Aspergillus terreus</i> (XP_001208969)	78	85
Putativa C1 THFS	<i>Aspergillus clavatus</i> (EAW09459)	79	85

(*)* Números de acesso no GenBank.

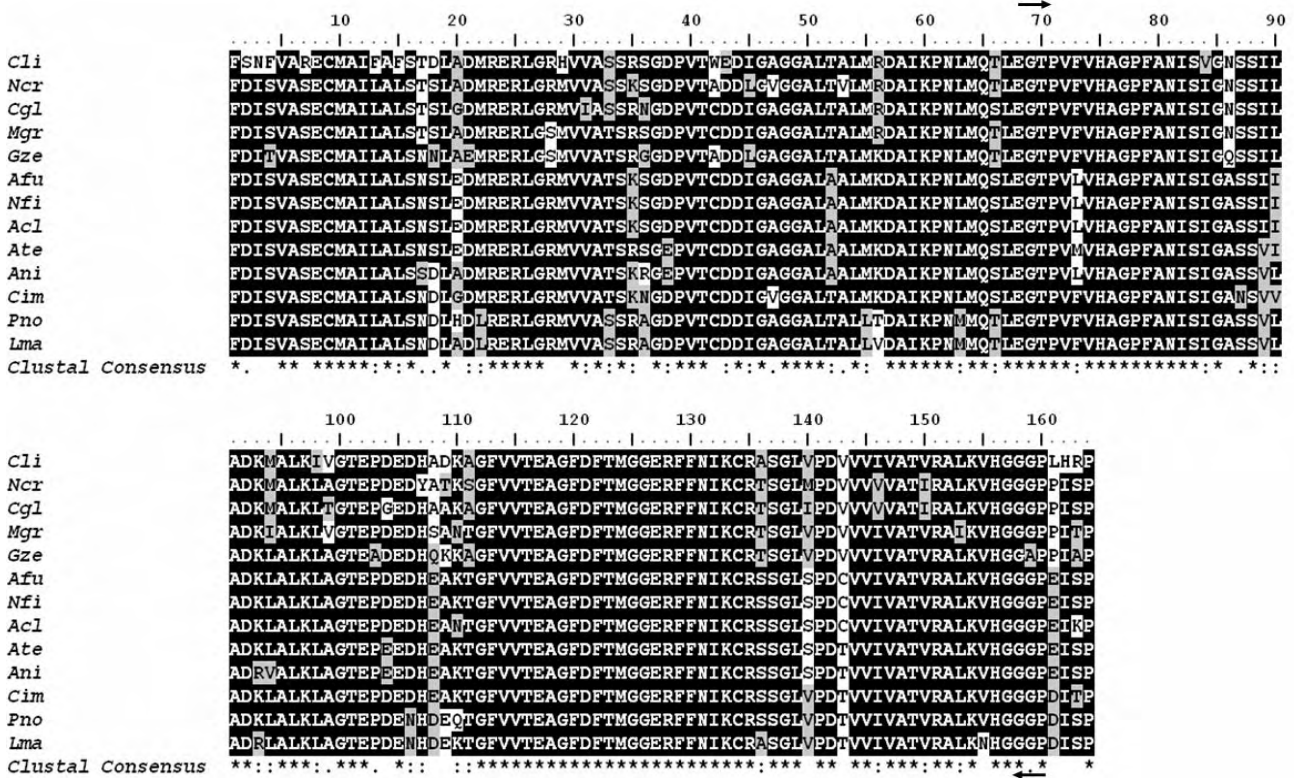


Figura 9. Alinhamento da proteína codificada pelo gene putativo *thfC1* de *C. lindemuthianum* com proteínas de outros fungos. Setas indicam a região amplificada no RT-PCR com os oligonucleotídeos RTRes2a e RTRes2b. Os organismos utilizados nessa análise e seus respectivos números de acesso no GenBank são: Nfi, putativa *thfC1* de *Neosartorya fischeri* (XP_001263575), Acl, putativa *thfC1* de *Aspergillus clavatus* (gb-EAW09459.1), Ate, *thfC1* de *Aspergillus terreus* (XP_001208969), Cim, proteína hipotética *Coccidioides immitis* (XP_001240508), Pno, proteína hipotética de *Phaeosphaeria nodorum* (EAT91241), Ncr, proteína hipotética de *Neurospora crassa* (XP_956550); Afu, *thfC1* de *Aspergillus fumigatus* (XP_754750); Mgr, proteína hipotética de *Magnaphorthe grisea* (XP_368230); Cgl, proteína hipotética de *Chaetomium globosum* (EAQ84661); Gze, proteína hipotética de *Gibberella zeae* (XP_390443); Lma, *thfC1* de *Leptosphaeria maculans* (AAM92144); Ani, *thfC1* de *Aspergillus nidulans* (AAK76729) e Cli, *Colletotrichum lindemuthianum* (não depositada).

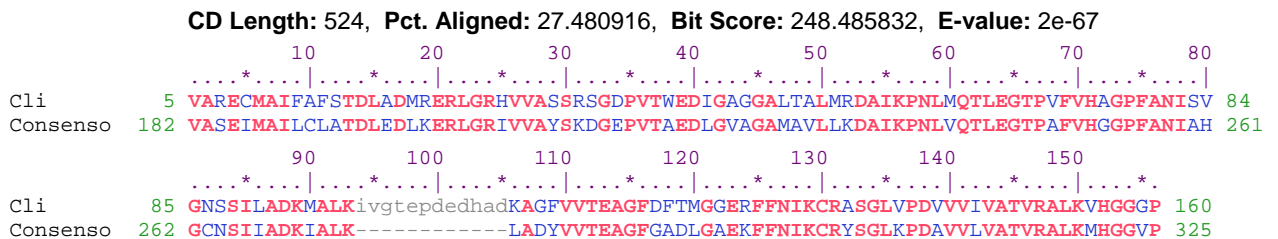


Figura 10. Domínio conservado na enzima Tetrahydrofolato Sintase (THF). Os aminoácidos conservados estão em negrito. Cli corresponde à proteína ThfC1 de *C. lindemuthianum* e consenso – seqüência consenso encontrada em proteínas C1 THF.

4.4.2. Plasmídeos pRescue7e pRescue16 obtidos do mutante mut29

Foram recuperados dois plasmídeos, pRescue7 e pRescue16, do genoma da linhagem mutante mut29. A sua obtenção só foi possível, quando o DNA total dessa linhagem foi digerido com *HindIII*. A obtenção de dois plasmídeos diferentes indica que o mutante mut29 possui, no mínimo, duas integrações do pAN7.1 no seu genoma.

4.4.2.1. Análise do plasmídeo pRescue7

A clivagem dupla *XbaI/ScaI* do pRescue7 originou um fragmento de aproximadamente 3.300 pb, contendo uma pequena seqüência do pAN7.1, sendo sua maior parte composta da seqüência do *C. lindemuthianum* (Figuras 6 e 11).

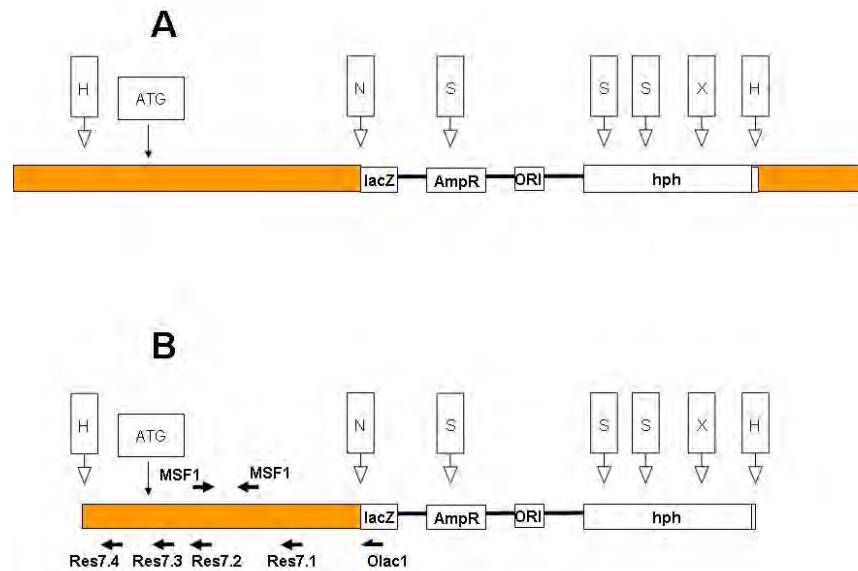


Figura 11. Esquema de inserção de uma das cópias do pAN7.1 no genoma do mut29 (A) e mapa parcial de restrição do plasmídeo pRescue7 (B) obtido a partir da linhagem mutante mut29. Retângulo cinza representa seqüência genômica interrompida em *C. lindemuthianum* e retângulos claros representam genes presentes no vetor pAN7.1. *HindIII* (H), *NarI* (N), *ScaI* (S) e *XbaI* (X). Setas indicam as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos Olac1, Res7.1, Res7.2, Res7.3 e Res7.4 utilizados no seqüenciamento, e o conjunto MSF1/MSF2 usados no RT-PCR.

A partir dos oligonucleotídeos Olac1, Res7.1, Res7.2, Res7.3 e Res7.4 foram seqüenciados 3.017 nucleotídeos utilizando-se o vetor pRescue7. A análise desta seqüência demonstrou que ela contém 2.684 nucleotídeos de uma seqüência específica de *C. lindemuthianum*. A diferenciação entre essas duas seqüências foi facilitada pela presença do sítio de restrição para a enzima *HindIII*, utilizada nos experimentos de recuperação do pRescue7. Este sítio foi regenerado pela ligação das

extremidades do fragmento, gerado pela clivagem do DNA total da linhagem mut29 (Figura 12).

Pelo seqüenciamento, foi verificado um evento REMI na integração de uma das extremidades analisada do pAN7.1 (Figura 12). O sítio da enzima *NarI*, utilizada durante os experimentos de REMI, foi perfeitamente regenerado no local de junção entre o vetor e o DNA genômico de *C. lindemuthianum*, durante o processo de integração do pAN7.1.

Esta seqüência obtida contém uma ORF constituída de 1.725 pb, codificando um polipeptídeo de 539 aminoácidos com uma massa molecular de 60,2 kDa (Figura 13). A região codificadora é interrompida por dois possíveis íntrons de 46 e 59 pb, que possuem a seqüência consenso 5' e 3' de fungos, GTANGT e PyAG, respectivamente, envolvidas no processamento de retirada de íntrons e também descrito para outros íntrons de *C. lindemuthianum* (Veneault-Fourrey et al., 2005). Outros genes isolados de *C. lindemuthianum* possuem íntrons, variando de 53pb no gene *clpls1* (Veneault-Fourrey et al., 2005) a 227 pb presente no gene *clnr1* (Pellier et al., 2003).

A pesquisa, realizada com o emprego do BLAST (Altschul et al., 1997) demonstrou que o polipeptídeo de 539 aminoácidos, deduzido a partir da ORF, foi conservado em diversas proteínas hipotéticas e em uma proteína transportadora do tipo MSF de fungos filamentosos e leveduras (Tabela 4). Esta ORF, denominada *msfCl*, codifica um transportador putativo do tipo MSF em *C. lindemuthianum*.

A MSF (“Major Facilitator Superfamily”) é um conjunto de proteínas relacionadas ao transporte de solutos através da membrana plasmática das células, de forma ativa, utilizando energia quimiosmótica. Esses transportadores são constituídos por um único polipeptídeo capaz de transportar somente pequenos solutos em resposta a um gradiente quimiosmótico de íons (Pao et al., 1998). Eles transportam diferentes tipos de solutos, como íons, açúcares, ácidos orgânicos, nucleosídeos e até mesmo drogas (Pao et al., 1998). Em fungos patogênicos, esses transportadores são capazes de proporcionar resistência a múltiplas drogas, pois atuam como bombas de efluxo, enquanto em fungos fitopatogênicos, eles estão relacionados à secreção de diversas toxinas que são fatores de virulência (Del Sorbo et al., 2000).

Pao et al (1998) propuseram a classificação dos transportadores MSF em 17 famílias, de acordo com o modo de transporte, especificidade do substrato e

homologia de seqüências desses transportadores. A proteína MsfCl está provavelmente relacionada ao transporte de açúcar, pois, possui uma pequena região contendo um domínio conservado em transportadores deste soluto.

De acordo com o resultado obtido com a utilização do programa TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>), MsfCl possui 12 domínios (10 domínios com alta significância e 2 putativos) transmembrana (Figura 14). Esta estrutura organizacional é característica das proteínas MSF, que apresentam 12 ou 14 desses domínios (Pao et al., 1998). O “loop” citoplasmático entre os domínios VI e VII é maior do que os outros “loops”, sendo consistente para as outras proteínas MSF relatadas na literatura (Figura 15) (Pao et al., 1998). Weinglass et al. (2000) propuseram que este “loop” otimiza a inserção do transportador lac permease na membrana citoplasmática de *E. coli*.

O padrão de inserção deduzido (Figura 11) pela análise do seqüenciamento do pRescue7 sugere que o vetor pAN7.1 integrou na região 3' após o gene *msfCl*. Como a integração não ocorreu na região codificadora desse gene, o fenótipo mutante não deve ser resultado desta integração.

Na interação patógeno-planta, a aquisição eficiente de nutrientes pelo patógeno é de extrema importância para a efetiva colonização do tecido vegetal. A expressão e regulação de genes no patógeno, relacionadas à aquisição de metabólitos no hospedeiro, são importantes para a adaptação às condições de colonização e estabelecimento do mesmo no tecido vegetal. Alguns desses genes, codificando transportadores de aminoácidos e carboidratos, sofrem ativação na transcrição durante a colonização do tecido vegetal pelo fitopatógeno *Uromyces fabae* (Voegelé et al., 2001; Wirsel et al., 2001).

O gene *msfCl* pode estar envolvido com a patogenicidade de *C. lindemuthianum*. A geração de um mutante deficiente na expressão de *msfCl*, dará a medida exata de sua participação na capacidade deste fitopatógeno em colonizar o tecido do feijoeiro.

```

1      TGGGTTTCGCAAAGATATGCACTGTTCTTCTTCTTGAACCTCTCAAGCCTACAGGACACACATTCATCGTAGGTATAAACCTCGAAAATCATTCTACTAAGATGGGTATACAATAGTAACCAT
121    GCATGGTTGCCTAGTGAATGCTCCGTAACACCCAATACGCCGGCCGAAACTTTTTTACAACCTCTCCTATGAGTCGTTTACCCAGAATGCACAGGTACACTTGTTTTAGAGGTAATCCTTCT
241    TTCTAGAAGTCCCTCGTGTACTGTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGACCAAACGAGAGAGACCCTTGTCCCGGCTGCTTCTGTAGTCAGTCCCC
361    TGGCCGCAGCTCCGACAGTCTGTTCCAGACCCTGGAGCTTATCTGCGATCCGAGTCTCGAGAAGAACAGTCGAGGGTGTGCTGTGTGCAAGTTAATTCTTCTGTTCTGTACGGAGCATTCT
481    GTGACTGGATTTCAAATCTCCTGGACTCTCCTTTCTGTCCATCCATGACTCATGCAAGCGCCGATTTCCATCTTTATTATAGTGAACCACTGCCGTTAGACATCGTCCTATTGTCCCGCCG
601    ACAAAGGAAGTACAGGGGTTAAAACAGACCAAGAGAAAAAATtgcgaatcggccgatgagcaagCGCGTTTGATATCTGTACGACACCCCGCCGCTTTTACCAGACCCCGCCGCGTCTG
721    CCGGGCCGCTATTCTTGACTCGACGATCCAGCATCGGATCGGAATCCAAGGGAGTGGCTTTTGTGTTGAGTACCCCAAGGACCCAACCACCTCTCGTCTCCGACTCAGCCGCAGCGCT
841    CTTCTGCGCTAGGAATCCTCACAGACGTTGGTTCGCAAAGATCATTTTCTGTCCGCATTGAGCCAACGCACCTGAAAAGCGCAGCAGGTCGTTGCGCAAGTGATCGTGATGGAGCCTTCA
961    AAGAAGGATGGCATTTCGCGACACCGACGCCTACGCCGACGCCGGACCCGGTGGAGCTCACCGGACGTCGATCCCCAAGACCCTGCGTCCGCCGACGACGATGTACAGACACTC
1081   AAGGAGAAGAACTGACGCGCAAGCTCGACACCCACCTCATTCCCCTGGTAATGGCTCTTTATCTCTTCAGTTTCTTAGATCGGGCAGTGCCGACCCATCCCCATCCCCCGTCTCGTA
1201   ACCGGGACATTCTGACCGTCTACAGCGTCAACATTGGCAACGCCCGCTGTATAACCTCGAGCAAGACCTCGGGCTGCAAGGCAACCAGTTCCAAGTCGCCGTTTCCATTCTCTTCGTC
1321   ACCTACATCATCTTCGAGGTCGGTCCAACCTTGTCTCAAACCTTTCACCCCGAGTCGCTGGATCGCCTTCATCACCGTGTGTTGGGGCAacatcgctaccctgacgggtctGGTCGAG
1441   TGTACGGCTCGCTTGTTCCTGCCGCTGCTCCTTGGGCCGTGAGGGCCGGTCTTTCCCCGGGCTGAAGTCTACCTCACATTTTACAGCAAGCACGAGCTCGCGCTCAGGGTGGGATAC
1561   CTTtgcggtggegeegccategeagGTGGTCTGGGGGGTGTGCTTGCCTTGGCATCGGGCACAGGAGGGCGTGGCGGGTTTGTAGCGGGTGGCGGTGGATCATGATCATCGAGGGGCTGCCG
1681   MSF2 ACGGTCATTTTGGTCGTTGCGTACTTTGCGCTCCCCGACGAGTTGAGAGCGCGTACTTTCTGCGGAGGAGAAAAGCCATCATGGTTTCGAGAGAGagggcggaatacggqaacacgacc
1801   AGCGCGCAGGAGTTCAGTCGGGAGGACATGTGGAAGGCGTTCAAGGACTGGAGGGTTGGCTCTTCTCGGTGGCGCAGTTCGGCGTCGACACGATGCTTTACGGCCgtaggtaggtgcag
1921   ctgcaggtggtttgggatttgttaccagCCTTGACAGGATTCTCGACGTTTCTTCCGACCATCATCAACGGTCTCGGATCGTGACGACCGCTCAGGTTACGCTGCTAACCGTGCC
2041   GTGTTAgtttgttgcggttgtetaCCTCTCCATGGCGTTCCTGTCCGATCGAAGCCAACGGCGAGGCCTCTTCTGCGTCATCTTTGGAAGTCTCAGCGTTATCGGATACGGCGTGCT
2161   GATTTCCAACACATCTTCCGGCGTCCACTACTTCCGGTGCTTCTTGTGCGGGCTGGGCTGTATGTCGTTGTTGGCCTGCCACTGGCATGGGgtaggttttgcctttcttgtgattgaga
2281   catgatgtttccggcttacgtgtcggttcagGGCTTCCGAACAACACACCGAGATATGGGAAGAGAACGACTGCAAACGGGATGCAGTTGACCATCGGTAACCTGCTCTGGCGTCATGTCG
2401   GCTTTTCATCGTCTGCTCGTTCGGCGCCACCATTTCGTTGACGTGACGGACGACCAGTCAAGCTGTGACAACCTAGGTATAACCGCGGCCATGCACTTACACTTAGTATGGTAGGTATG
2521   GCCACCTGCATGTATGGTTtcttgggttctggtatgcccgggagAATAGGAAGCGCGAGGCTGGTCATCTGGAGGATAAGTACCGCGATATGTGCGACGACGAGCTGGCAGAACTCGGA
2641   GACGACAGCCCGCGATTGAGATACACCATTTGAAGAACACGTTGATTGGAATGGGGTCTCGAAGCCATACATGGAGCGGAGCAAAGGAAACCGCGGAAGACAGATACAGCTCGGATCGTG
2761   TTTTAATGAAAAATGCCCTTTTAGAACGTAGTCTCAACTACTTATGACTACGGATGATCTTACTATATGGAGCAGTTTACACATAGCCTCGGGAATGAATCTGAAATTGTTCTCTACTCC
2881   CAAAATGAAGAATATTTGTGAGAAAAGCAAAAATGAAAGGGACGAGACTCGAAGTTCGCGCGGGTTGCCCCACCAGGAAACAGGTGTTAAGCTGACCTTAACCTGGCGCCTGGATGCGGTAT
3001   TTTCTCCTTACGCATCT
      .....

```

Figura 12. Sequência de 2.976 nucleotídeos obtida a partir do sequenciamento do pRescue2. Regiões pertencentes ao pAN7.1 estão representadas por linhas pontilhadas. As setas, sob as letras minúsculas, indicam as regiões e o sentido de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e no RT-PCR. O primeiro e o segundo retângulo representam os sítios das enzimas *HindIII* e *NarI*, respectivamente. Entre parênteses estão representados dois íntrons interrompendo a sequência do provável gene *mfsCl*. E o códon de início (ATG) e término (TGA) da tradução estão sublinhados por linhas.

```

1 ATG GAG CCT TCA AAG AAG GAT GGC ATT CGC GAC ACC GAC GCC TAC 45
1 M E P S K K D G I R D T D A Y 15
46 GCC GAC GCC GGA CCC GGA CCC GGT GCG AGC TCA CCG GAC GTC GAT 90
16 A D A G P G P G A S S P D V D 30
91 CCC CAA GAC CCT GCG TCC GCC GAC GAC GAT GTA CAG ACA CTC AAG 135
31 P Q D P A S A D D D V Q T L K 45
136 GAG AAG AAA CTG ACG CGC AAG CTC GAC ACC CAC CTC ATT CCC CTG 180
46 E K K L T R K L D T H L I P L 60
181 GTA ATG GCT CTT TAT CTC TTC AGT TTC CTA GAT CCG GCA GTG CCG 225
61 V M A L Y L F S F L D R A V P 75
226 ACC CAT CCC CCA TCC CCC CGT CTC GTA ACC GGG ACA TTC CTG ACC 270
76 T H P P S P R L V T G T F L T 90
271 GTC TAC AGC GTC AAC ATT GGC AAC GCC CGC CTG TAT AAC CTC GAG 315
91 V Y S V N I G N A R L Y N L E 105
316 CAA GAC CTC GGG CTG CAA GGC AAC CAG TTC CAA GTC GCC GTT TCC 360
106 Q D L G L Q G N Q F Q V A V S 120
361 ATT CTC TTC ACC TAC ATC ATC TTC GAG GTC CGG TCC AAC CTT 405
121 I L F V T Y I I F E V R S N L 135
406 GTC CTC AAA CTC TTC ACC CCC AGT CGC TGG ATC GCC TTC ATC ACC 450
136 V L K L F T P S R W I A F I T 150
451 GTG TCG TGG GGC Aac atc gct acc ctg acg ggt ctG GTC GAG TGT 495
151 V S W G N I A T L T G L V E C 165
496 ACG GCT CGC TTG TTG CCT GCC GCC TGC TCC TTG GGC CGT CGA GGC 540
166 T A R L L P A A C S L G R R G 180
541 CGG TCT TTC CCC GGG CTG AAG TCT ACC TCA CAT TTT TAC AGC AAG 585
181 R S F P G L K S T S H F Y S K 195
586 CAC GAG CTC GCG CTC AGG GTG GGA TAC CTT tcg gtg gcg ccg cca 630
196 H E L A L R V G Y L S V A P P 210
631 tcg cag GTG GTC TGG GGG GGT TGC TTG CGT TGG CAT CGG GCA CAG 675
211 S Q V V W G G C L R W H R A Q 225
676 GAG GGC GTG GCG GGT TTG AGC GGG TGG CGG TGG ATC ATG ATC ATC 720
226 E G V A G L S G W R W I M I I 240
721 GAG GGG CTG CCG ACG GTC ATT TTG GTC GTT GCG TAC TTT GCG CTC 765
241 E G L P T V I L V V A Y F A L 255
766 CCC GAC GAG TTG AGA GCG CGT ACT TTC CTG CCG AGG AGA AAA GCC 810
256 P D E L R A R T F L P R R K A 270
811 ATC ATG GTT TCG AGA GAG agg cgg gaa tac ggg aac acg acc AGC 855
271 I M V S R E R R E Y G N T T S 285
856 GCG CAG GAG TTC AGT CGG GAG GAC ATG TGG AAG GCG TTC AAG GAC 900
286 A Q E F S R E D M W K A F K D 300
901 TGG AGG GTT TGG CTC TTC TCG GTG GCG CAG TTC GGC GTC GAC ACG 945
301 W R V W L F S V A Q F G V D T 315
946 ATG CTT TAC GGC CCC TTG ACA GGA TTC TCG ACG TTT CTT CCG ACC 990
316 M L Y G P L T G F S T F L P T 330
991 ATC ATC AAC GGT CTC GGA TCG TGG ACG ACC GCT CAG GTT CAG CTG 1035
331 I I N G L G S W T T A Q V Q L 345
1036 CTA ACC GTG CCG TGT TAc ttt gtt gcc gcg gtt gtc taC CTC TCC 1080
346 L T V P C Y F V A A V V Y L S 360
1081 ATG GCG TTC TCC GAT CGA AGC CAA CGG CGA GGC CTC TTC TGC 1125
361 M A F L S D R S Q R R G L F C 375
1126 GTC ATC TTT GGA AGT CTC AGC GTT ATC GGA TAC GGC GTG CTG ATT 1170
376 V I F G S L S V I G Y G V L I 390
1171 TCC AAC ACA TCT TCC GGC GTC CAC TAC TTC GGG TGC TTC CTT GTC 1215
391 S N T S S G V H Y F G C F L V 405
1216 GCG GCT GGG CTG TAT GTC GTT GTT GGC CTG CCA CTG GCA TGG GGG 1260
406 A A G L Y V V V G L P L A W G 420
1261 CTT CCG AAC AAC ACA CCG AGA TAT GGG AAG AGA ACG ACT GCA AAC 1305
421 L P N N T P R Y G K R T T A N 435
1306 GGG ATG CAG TTG ACC ATC GGT AAC TGC TCT GGC GTC ATG TCG GCT 1350
436 G M Q L T I G N C S G V M S A 450
1351 TTC ATC GTC TGC TCG TTC CCG CGC CAC CAT TTC GTT GAC GTG ACG 1395
451 F I V C S F P R H H F V D V T 465
1396 GAC GAC CAG TCA AGC TGT CGA CAA CCT AGG TAT AAC CGC GGC CAT 1440
466 D D Q S S C R Q P R Y N R G H 480
1441 GCA CTT ACA CTT AGT ATG GTA GGT ATG GCC ACC TGC ATG TAT GGT 1485
481 A L T L S M V G M A T C M Y G 495
1486 Ttc ttg tgg ttc tgg tat gcc cgg gag AAT AGG AAG CGC GAG GCT 1530
496 F L W F W Y A R E N R K R E A 510
1531 GGT CAT CTG GAG GAT AAG TAC CGC GAT ATG TCG GAC GAC GAG CTG 1575
511 G H L E D K Y R D M S D D E L 525
1576 GCA GAA CTC GGA GAC GAC AGC CCG CGA TTC AGA TAC ACC ATT TGA 1620
526 A E L G D D S P R F R Y T I *

```

Figura 13. Sequência nucleotídica da ORF encontrada no pRescue7. Os dois introns foram retirados e a sequência foi traduzida em uma proteína de 539 aminoácidos.

Tabela 4. Porcentagem de similaridade e identidade do polipeptídeo de 539 aa, obtido a partir da seqüência do plasmídeo pRescue2, com diversas seqüências de proteínas fúngicas.

PROTEÍNA	ORGANISMO	IDENTIDADE (%)	SIMILARIDADE (%)
Proteína hipotética	<i>Magnaporthe grisea</i> (XP_368064.1)*	57	72
Proteína hipotética	<i>Gibberella zeae</i> (XP_390985.1)	51	62
Proteína hipotética	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (EAT80581.1)	50	63
Transportador do tipo MSF	<i>Aspergillus clavatus</i> (EAW08833.1)	51	64
Transportador do tipo MSF	<i>Aspergillus fumigatus</i> (XP_747804.1)	48	63
Proteína hipotética	<i>Yarrowia lipolytica</i> (XP_505981.1)	34	50

(*) Números de acesso no GenBank.

```

MEPSKKDGIR DTDAYADAGP GPGASSPDVD PQDPASADDD VQTLKEKKLT 50
RKLDTHLIPL VMALYLF SFL DRAVPTHPS PRLVTGTFLT VYSVNIGNAR 100
LYNLEQDLGL QGNQFQVAVS ILFVTYIIFE VR SNLVLKLF TPSRWLAFIT 150
VSWGNIATLT GLVECTARLL PAACSLGRRG RSFPGLKSTS HFYSKHELAL 200
RVGYLSVAPP SQVWGGCLR WHRAQEGVAG LSGWRWIMII EGLPTVILVV 250
AYFALPDEL R ARTFLPRRKA IMVSRERREY GNTTSAQEF S REDMWKAFKD 300
WRVWLF SVAQ FGVDTMLYGP LTGFSTFLPT IINGLGSWTT AQVQLLTVPC 350
YFVAAVVYLS MAFLSDRSQR RGLFCVIFGS LSVIGYGVLI SNTSSGVHYE 400
GCFLVAAGLY VVVG LPLAWG LPNNTPRY GK RTTANGMQLT IGNC SGVMSA 450
FIVCSFPRHH FVDVTDDQSS CRQPRYNRGH ALTL SMVGMA TCMYGF LWFV 500
YARENKREA GHLEDKYRDM SDDELAELGD DSPRF RYTI 539

```

Figura 14. Predição de topologia da proteína MsfCl feita pelo programa TopPred. As regiões marcadas representam os domínios transmembrana. As seqüências de aminoácidos marcadas e sublinhadas são domínios putativos.

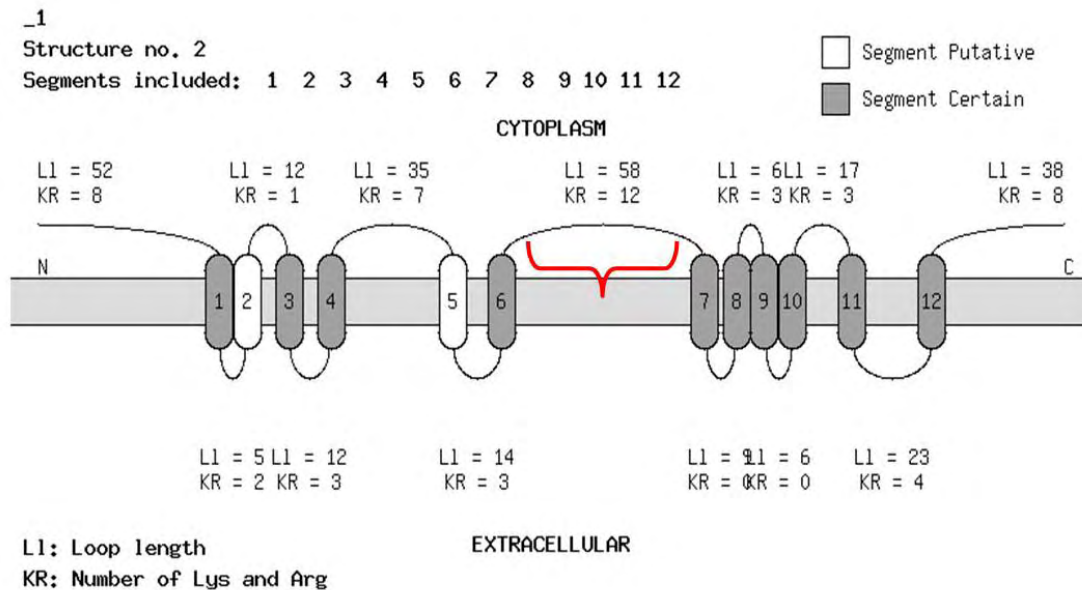


Figura 15. Modelo da inserção da proteína MsfCI na membrana plasmática sugerido pelo programa TopPred. A região entre os domínios 6 e 7, evidenciada pela chave, é a maior alça contendo 58 resíduos de aminoácidos e direcionada para o lado citoplasmático.

4.4.2.2. Análise do plasmídeo pRescue16

A clivagem do pRescue16 com as enzimas *XbaI/ScaI*, recuperado do mutante mut29, demonstrou que ele possui seqüência do DNA genômico de *C. lindemuthianum*, contida no fragmento de 2.440 pb (Figuras 6 e 16).

Após o seqüenciamento do pRescue16, utilizando os oligonucleotídeos Olac1, Res16.1 e Res16.2, foi obtida uma seqüência de 1.656 nucleotídeos, que flanqueava a seqüência do pAN7.1 (Figura 16). Assim como observado no pRescue7, o sítio *NarI* foi perfeitamente regenerado no local de integração da extremidade do vetor pAN7.1 analisada, caracterizando outro evento REMI. Da mesma forma, o sítio de restrição de enzima *HindIII*, utilizada na recuperação do pRescue16, foi perfeitamente recuperado durante a ligação com a T4 ligase, facilitando a distinção entre a seqüência do vetor e a do *C. lindemuthianum* (Figura 17).

A análise da seqüência por busca de similaridades, utilizando o BLAST (Altshul et al., 1997), demonstrou uma região de 309 pb, adjacente ao sítio de integração do pAN7.1, com alta similaridade a proteínas de fungos filamentosos.

A tradução desta seqüência corresponde à região carboxi terminal de proteínas hipotéticas e à enzima fosfolipase C de fungos filamentosos (Tabela 5), apresentando um domínio C2 conservado, e responsável pela ligação ao íon Ca^{2+} , presente em algumas proteínas, inclusive em fosfolipase C. Portanto, esse gene foi denominado *plcCl* (Figura 17).

Fosfolipase C, específica para fosfatidilinositol PI-PLC, hidrolisa o fosfolipídio fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato lançando dois mensageiros secundários, o inositol 1,4,5-trifosfatado/IP₃ e diacilglicerol. O IP₃ estimula o lançamento de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, e esse íon por sua vez ativa enzimas calmodulina-dependente (Ochocka & Pawelczyk, 2003). O diacilglicerol, entretanto, é uma molécula capaz de ativar uma família de proteínas cinases fosfolipídios-dependentes (Nishizuka, 1992). Isto demonstra claramente a importância da proteína Fosfolipase C na via de transdução de sinal, importante para diversos processos celulares.

Existem quatro isoformas de PI-PLC's em mamíferos (β , γ , δ e ϵ) com diferenças em sua organização estrutural, funcionalidade e localização subcelular (Rhee, 2001). Em eucariotos inferiores, como leveduras e fungos filamentosos, somente a isoforma δ foi descrita, o que leva a crer que esta seja a isoforma ancestral da qual as outras Fosfolipase C divergiram (Flick & Thorner, 1993; Rhee, 2001; Chung et al., 2006).

A isoforma δ é constituída por um único polipeptídeo, que consiste de quatro domínios conservados. C2 é um desses domínios, e está presente na região carboxi terminal das PI-PLC δ . Neste trabalho, foi recuperada a região carboxi-terminal de um polipeptídeo, justamente contendo um domínio C2 putativo, corroborando a hipótese de que o vetor pAN7.1 interrompeu o gene *plcCl* no mut29.

O domínio C2 está relacionado à ligação da proteína fosfolipase C a fosfolipídios de maneira dependente de Ca^{2+} , sendo essencial à atividade enzimática (Essen et al., 1997; Rizo & Südhof, 1998; Ochocka & Pawelczyk, 2003). Como o mut29 possui uma integração do pAN7.1 na região desse domínio, possivelmente a enzima PlcCl não é funcional no mesmo.

Linhagens mutantes de *S. cerevisiae* para o gene *plc* são viáveis, porém sensíveis à temperatura e estresse osmótico, incapazes de utilizar determinadas fontes de carbono e apresentam deficiência na segregação de cromossomos (Flick & Thorner, 1993; Lin et al., 2000). A proteína PLC também atua em vias diferenciação de pseudohifa em *S. cerevisiae*, tanto na via dependente de cAMP ou na via controlada por Ras2 (via MAPK) (Flick et al., 1998; Ansari et al., 1999). Em outros organismos modelos, como *Dictyostelium*, foi demonstrada a importância da PLC δ na regulação da germinação dos seus esporos (Van Dijken & Van Haastert, 2001). A literatura da funcionalidade de fosfolipases C em fungos filamentosos é ainda escassa. Chung et al. (2006) isolaram o gene codificando uma fosfolipase C δ - *cplc1* do fungo *Cryphonectria parasitica*. O fragmento da *plcCl* de *C. lindemuthianum* apresentou 61% e 76% de identidade e similaridade, respectivamente, com o gene *cplc1*. Este gene é necessário para o crescimento normal e diferenciação do micélio e possui um papel importante na taxa de crescimento e na morfologia do micélio, assim como na expressão do gene que codifica a lacase (*lac1*).

A alteração morfológica, observada após a germinação dos conídios da linhagem mut29 (Figura 4), pode ser reflexo da mutação no gene *plcCl*. Conforme discutido anteriormente, esta linhagem mutante apresenta um diferente padrão de germinação dos conídios e ramificação do tubo germinativo, além do atraso na diferenciação do apressório, quando inoculada em hipocótilo de feijoeiro.

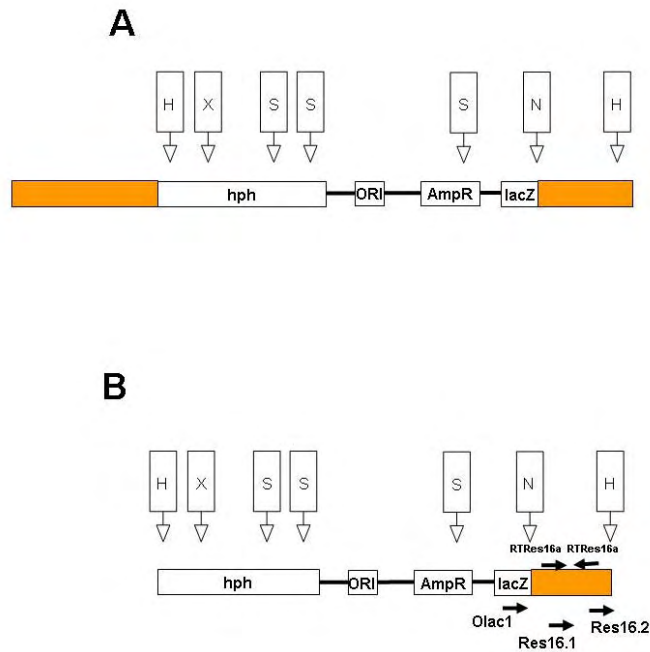


Figura 16. Esquema da inserção da segunda cópia do pAN7.1 no genoma do mut29 (A) e mapa parcial de restrição do plasmídeo pRescue16 (B) obtido a partir da linhagem mutante mut29. Retângulos cinzas representam seqüências do DNA genômico do *C. lindemuthianum* interrompida pela inserção do vetor, e retângulos claros representam genes presentes no vetor pAN7.1. *Hind*III (H), *Nar*I (N), *Sca*I (S) e *Xba*I (X). Setas indicam as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos Olac1, Res16.1 e Res16.2 utilizados no seqüenciamento, e o conjunto RTRes16a/RTRes16b usados no RT-PCR.

1	gatg	cgta	aagg	aaaa	tacc	gcat	ca	GGCGCC	CGC	ATC	AAG	AAC	45			
1									R	I	K	N	15			
46	GAC	GGC	CGC	GAG	CAG	GAG	GGC	GAG	TAC	AAG	GCC	AAG	ACC	AAG	TCG	90
16	D	G	R	E	Q	E	G	E	Y	K	A	K	T	K	S	30
91	AAC	CGC	GGC	GTC	GAC	CCG	GAC	TTC	AGG	GGC	GAG	GGG	CTC	AAG	TTC	135
31	N	R	G	V	D	P	D	F	R	G	E	G	L	K	F	45
136	GCG	GGC	GTC	CCC	GGC	GTC	GTG	GAG	GAG	CTC	ACC	TTT	GTG	CGC	TTC	180
46	A	G	V	P	G	V	V	E	E	L	T	F	V	R	F	60
181	ACC	GTG	CGC	GAC	GAC	GAG	ATT	GGG	AGG	GAC	GAT	TTG	GCG	GCC	TGG	225
61	T	V	R	D	D	E	I	G	R	D	D	L	A	A	W	75
226	GCG	GCG	GTG	AGG	TTG	GAC	CGG	CTG	AGG	GCG	GGG	TAC	AGG	TTC	GTG	270
76	A	A	V	R	L	D	R	L	R	A	G	Y	R	F	V	90
271	CAT	CTC	ATG	GAC	TGC	GAG	GGG	AGG	TTG	ACC	GAG	GGC	GTC	GTC	TTG	315
91	H	L	M	D	C	E	G	R	L	T	E	G	V	V	L	105
316	GTG	AGG	ATC	ACG	AAG	CGG	GTT	TAC	TGA	AGCATAGCATAGCGTGAT					360	
106	V	R	I	T	K	R	V	Y	*							
361	GGCATCGTGGCATTACTTGGACAGCATCATCCAATGCGAAATTTT															405
406	GGCATTGAGACGGGATATATGAGCTCGCTAGATTGATACCTCAA															450
451	AACAAGAGAAACAACAGAAATCGGTGCTGAAAGGACGTCTTAGTA															495
496	GTCGTTGTCACCATACCCTTGGCCTCGCGCTTCCCGTGGCCCTT															540
541	TTTCTCAAGCTTCTCGCTGTTGAAGACGGACCCGGCCTTCTCCA															585
586	GCACCTTGCCGAGCTTCCCTGTGCGCCCTTGAATGCCGCGTGCCGG															630
631	TCGTCGTCCTTGTACGGCGCGACGAGCCGTAAGAGTCCGCGTTG															675
676	CCGTAGGAATCCGTGTTGTCGCGCTGGAACCGTACGAGTCGCTG															720
721	TCGACGCGCCGAGGATCCGTACGAGTCGTCGTTGCGCCGTTG															765
766	GTGCCGTAGCTTCCACCCTCTTTTCTCCCGGAAGATCCGTACGAG															810
811	TCCTCGTCCCTGCGGGAAGATCCGTACGAGTCCTCGGCCTTGCGG															855
856	GAAGATCCGTACGAGTCGTTGTCGCGTACGACGAAGGGTCGTTG															900

901 TCGAACGTGCGGCCATTGTTCTCGGAGGCGTTGTAGGAGAGGGAG 945
 946 TCGGGCGCCGGCGAGGTTGGACGAGGTGGAGTCGCCAAAGGAGGAG 990
 991 TGTTTCACGGGGCGGTCCGAGCCGTAGCTGTTGTCATTGTCGCGG 1035
 1036 GAGGAGCCGTACGAGTCCTCGTTGCGGGAACCGTAGCTGTTGTTG 1080
 1081 TTGTTGTCGTGCGGGGAGGAACCGTACGAGTCCTCGTTGTCGCGG 1125
 1126 CGGCCGCTGGTGTACGAGTCGCTGTTGGACTGGCCGTAGCCCGAT 1170
 1171 GTGCCGTAGCCCGAGGAGTTGTCGTCCTGCGAGAGGAGCCGAAT 1215
 1216 TCGTCGTTGTCGTTGCGGAAGCCCGGCTTCCGCCGAAGCCTTCC 1260
 1261 TGTTTCGCCGTAGAAGCGGAGTTGGACTCGGAAAGTGTGTTAGTGG 1305
 1306 GGTGGGAGGTTGTCACGACGGGATGGTCTGATGTTGGCTTACAGT 1350
 1351 ATCGTTGCCCGCGTAAGACATGGTTGCTGTAGAATCTACTCGGGT 1395
 1396 TTTTTTTTTTAAGTTGCTGTAGATGAGCTTGCAAAGCGGGATACCC 1440
 1441 AAACGGCCGGTCGAGGGTACTTAAATGGGCATTCGATGCCTTCT 1485
 1486 GCATCTCGACGGTGTGGCTGGTCTCAGTCTCACATGTGTCCCTAG 1530
 1531 CAGAGGGACCTCCCGATCGACATGGCAGTGGCCCATCGAGCGTG 1575
 1576 TGTTTCGGGGGCGCTAGGTAACGCATGTTTACGACATTTCCAGGA 1620
 1621 ATCCCCGCGTCCTTGGCACGAGCAAGATGGGTTTGAAGCGGAATG 1665
 1666 GACGGCGTCCTGagcttgcatgcctgcaggtcgagtgg 1704

Figura 17. Seqüência de nucleotídeos do pRescue16 e a seqüência de aminoácidos da região com identidade à fosfolipase C. Regiões marcadas em cinza representam local de anelamento dos oligonucleotídeos RRes16a e RRes16b, Res16.1 e Res16.2, respectivamente; letras minúsculas representam seqüência do pAN7.1; e as regiões sublinhadas demonstram os sítios regenerados das enzimas *NarI* e *HindIII*, respectivamente.

Tabela 5. Porcentagem de similaridade e identidade da região C-terminal de um polipeptídeo contendo 102 aminoácidos, obtido a partir da seqüência de DNA presente no pRescue16, com diversas seqüências de proteínas fúngicas.

PROTEÍNA	ORGANISMO	IDENTIDADE (%)	SIMILARIDADE (%)
Proteína hipotética	<i>Magnaporthe grisea</i> (XP_359445.1)*	62	86
Proteína hipotética	<i>Gibberella zeae</i> (XP_386869.1)	62	82
Fosfolipase C – específica de fosfatidil inositol	<i>Cryphonectria parasitica</i> (AAV97932.1)	61	76
Fosfolipase C	<i>Neurospora crassa</i> (AAZ23794.1)	61	76
Fosfolipase C – específica de fosfatidil inositol	<i>Neosartorya fischeri</i> (XP_001263649.1)	52	67
Fosfolipase C – específica de fosfatidil inositol	<i>Aspergillus fumigatus</i> (XP_754820.1)	51	67

* Números de acesso no GenBank.

4.5. Regulação dos genes recuperados utilizando RT-PCR

4.5.1. Transcrição do gene *thfCl* putativo

Os estudos de transcrição do gene *thfCl* foram realizados por RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos RTRes2a/RTRes2b, desenhados para amplificar uma região de 277 pb (Figuras 7 e 8).

O teste inicial dos oligonucleotídeos demonstrou a amplificação do fragmento, a partir de RNA total isolado do tecido do feijoeiro, após cinco dias de infecção e do micélio crescido em meio de cultura líquido (Figura 18).

Não foi possível a utilização dos mesmos para estudar a transcrição do gene *thfCl* durante o curso da infecção, pois eles não foram específicos para o RNA fúngico. Eles são capazes de anelar no RNA do feijoeiro e amplificar um fragmento de mesmo tamanho que o obtido, quando se utilizou a matriz de origem fúngica (Figura 19).

Possivelmente, existe uma grande homologia ao nível de seqüência de DNA entre os gene da Tetrahidrofolato Sintase do feijoeiro comum e do *C. lindemuthianum*, baseando-se no mesmo tamanho de fragmentos amplificados. A clonagem e seqüenciamento do produto de RT-PCR, a partir do RNA total do feijoeiro, poderá confirmar esta hipótese.

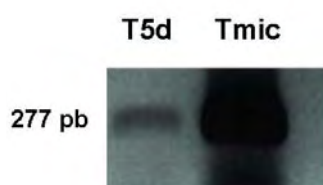


Figura 18. Transcritos do gene *thfCl* in planta e in vitro. Tecido vegetal (T5d) após 5 dias de inoculação e micélio crescido em cultura líquida (Tmic).

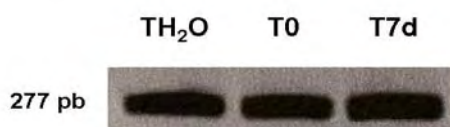


Figura 19. Transcritos do gene *thfCl* in planta. Tecido vegetal pulverizada com água (TH₂O), tecido vegetal imediatamente após inoculação de conídios (T0) e após 7 dias (T7d).

4.5.2. Transcrição do provável gene que codifica o transportador MSF (*msfCl*) e a fosfolipase C (*plcCl*)

A transcrição dos genes putativos *msfCl* e *plcCl* durante a infecção do feijoeiro por *C. lindemuthianum*, foi verificada por RT-PCR. O gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*), transcrito constitutivamente, foi usado como controle com o conjunto de oligonucleotídeos GPD1/GPD2.

Os oligonucleotídeos MSF1/MSF2, utilizados para a análise do gene *msfCl*, flanqueiam uma região de 504 pb contendo o intron de 46 pb (Figura 11 e 12). Nos experimentos de RT-PCR, foi detectado o fragmento de DNA de 458 pb, gerado pela retirada do íntron.

Foi detectada a presença do transcrito do gene *msfCl* 120h, após inoculação dos conídios no feijoeiro (Figura 20). Este é o período de transição do modo da fase biotrófica para a necrotrófica. O aumento da intensidade do sinal condiz com o aumento da biomassa do fungo no tecido vegetal. Isto é evidenciado pela progressão da amplificação do gene controle *gpd*, inicialmente, detectado às 24 h e aumentando sua detecção, progressivamente, até 240 h após a inoculação (Figura 19). Este resultado indica que o gene *msfCl* é transcrito constitutivamente em *C. lindemuthianum* durante o curso da sua infecção no feijoeiro.

Para detecção do transcrito do gene putativo *plcCl*, utilizou-se o conjunto de oligonucleotídeos RTRes16a/RTRes16b, que amplificam um fragmento de 241 pb na região 3' codificadora (Figura 17).

A detecção da transcrição do gene *plcCl* foi mais precoce em relação ao *msfCl*. O transcrito para o gene *plcCl* é detectado após 24h de inoculação, coincidindo com o início da fase biotrófica de *C. lindemuthianum*. Sua transcrição aumentou com a progressão da colonização do tecido hospedeiro, resultando no aumento da biomassa fúngica, estimada pela detecção do transcrito do gene *gpd* (Fig 20).

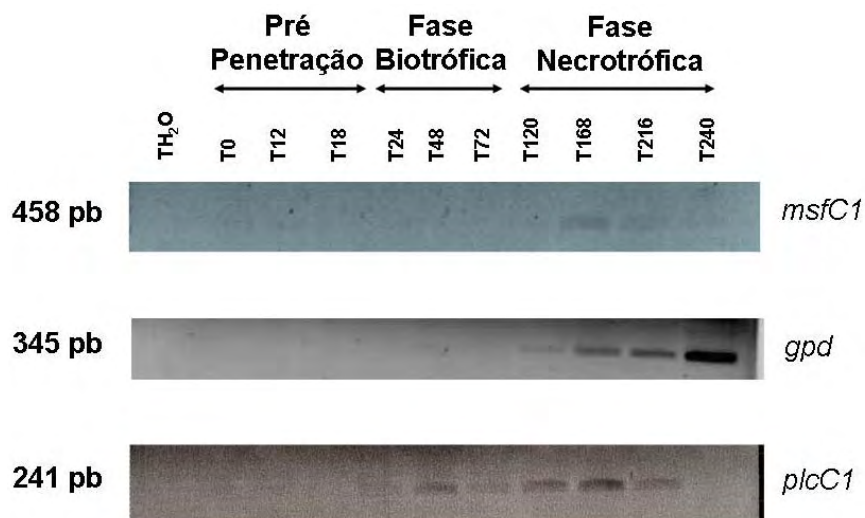


Figura 20. Transcrição dos genes *msfC1*, *plcC1* e *gpd* in planta. O tecido vegetal foi pulverizado com água (TH_2O). Os números que acompanham a letra T indicam tempo, em horas, após a inoculação do tecido vegetal com conídios do isolado selvagem de *C. lindemuthianum* LV49.

5. CONCLUSÕES

O uso da enzima de restrição *NarI* e do pAN7.1 na transformação de *C. lindemuthianum* aumentou cerca de 10x a eficiência da transformação;

A integração do vetor pode ser mediada pela enzima *NarI*, utilizada na transformação;

A mutagênese insercional é uma metodologia eficiente para obtenção de transformantes com patogenicidade ou virulência alteradas em *C. lindemuthianum*;

A linhagem mut5 apresenta um fenótipo peculiar, pois é capaz de fechar seu ciclo assexual sem infectar o tecido hospedeiro;

Os mutantes mut29 e mut65 apresentaram redução na virulência quando inoculados em folhas de feijoeiro excisadas;

O fenótipo da reação à inoculação das linhagens mut29 e mut65 variou de acordo com o tecido vegetal, utilizado na análise;

O gene interrompido no mutante mut65, possivelmente, codifica uma Tetrahydrofolato Sintase de acordo com a análise e alinhamento da seqüência parcial, obtida pela recuperação do plasmídeo pRescue2;

A linhagem mut29 possui, no mínimo, duas integrações do vetor pAN7.1: uma dessas, pRescue7, ocorreu após a região codificadora de um provável transportador do tipo MSF(*msfCl*); a segunda integração, pRescue16, interrompeu o provável gene codificador para a Fosfolipase C (*plcCl*);

A proteína deduzida do *msfCl* putativo possui domínios conservados em outros transportadores do tipo MSF;

O mutante mut29 pode ter tido sua virulência reduzida devido à mutação no gene *plcCl*;

Por meio da inativação gênica dos genes *thsCl* e *plcCl*, será possível esclarecer e confirmar a influência dos mesmos na virulência de *C. lindemuthianum*;

O gene *msfCl* é um bom candidato a gene de virulência, em razão de sua provável função no transporte de açúcar, o que poderá ser confirmado com a inativação do mesmo.

6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akamatsu, H.; Kodama, Y. I.; Otani, H.; Kohmoto, K. Aal- toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme mediated integration. *Phytopathology* 87 (1997) 967–72.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3389-02.
- Ansari, K.; Martin, S.; Farkasovsky, M.; Ehbrecht, I.M., and Kuntzel, H. Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274 (1999) 30052–58.
- Bölker, M.; Böhnert, H. U.; Braun, K. H.; Görl, J.; Kahmann, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular General Genetics* 248 (1995) 257–552.
- Brown, J.S.; Aufauvre-Brown, A.; Holden, D.W. Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Gen Genet* 259 (1998) 327–35.
- Casas-Flores, S.; Rosales-Saavedra, T.; Herrera-Estrella. A. Three decades of fungal transformation: novel technologies. *Methods Mol Biol.* 267 (2004) 315-25.
- Chung, H.J.; Kim, M.J.; Lim, J.Y.; Park, S.M.; Cha, B.J.; Kim, Y.H.; Yang, M.S.; Kim, D.H. A gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Cryphonectria parasitica* modulates the *lac1* expression. *Fungal Genet Biol.* 43(2006) 326-36.
- Chung, K.-R.; Ehrenshaft, M.; Wetzel, D.K.; Daub, M.E. Cercosporin-deficient mutants by plasmid tagging in the asexual fungus *Cercospora nicotianae* *Molecular Genetics and Genomics* 270 (2003) 103-13.
- Del Sorbo, G.; Schoonbeek, H.; De Waard, M.A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol* 43 (2000) 1–15.
- 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.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A.L.; Bailey, J.A.; Langin, T. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell* 12 (2000) 1579-89.

- Dufresne, M. Osbourn, A. E. Definition of Tissue-Specific and General Requirements for Plant Infection in a Phytopathogenic Fungus *MPMI* 14 (2001), 300–7.
- Duyvesteijn, R. G. E.; van Wijk, R.; Boer, Y.; Rep, M.; Cornelissen, B. J. C.; Haring, M. A. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato *Molecular Microbiology* 57 (2005) 1051–63.
- Essen, L.-O.; Peristic, O.; Lynch, D. E.; Katan, M.; Williams, R. L. A ternary metal-binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1. *Biochemistry* 36(1997) 2753–62.
- Flick, J.S.; Thorner, J. Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13 (1993) 5861–76.
- Granado, J. D.; Chaloupková, K. K.; Aebi, M.; Kües, U. Restriction enzyme mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Molecular General Genetics* 256 (1997) 28–36.
- Jin, X.; Ming-He, M.; Wei, Z.; Xiao-Wei, H.; Ke-Qin, Z. Transformation and Mutagenesis of the Nematode-trapping Fungus *Monacrosporium sphaeroides* by Restriction Enzyme-mediated Integration (REMI) *The Journal of Microbiology* 43 (2005) 417-23.
- Knogge, W. Fungal pathogenicity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998) 324-28.
- Latunde-Dada, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2 (2001) 187-98.
- Lewis, L. K.; Westmoreland, J. W.; Resnick, M. A. Repair of endonuclease-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*: essential role for genes associated with nonhomologous end-joining. *Genetics* 152 (1999) 1513–29.
- Lin, H., Choi, J. H., Hasek, J., DeLillo, N., Lou, W.; Vancura, A. Phospholipase C is involved in kinetochore function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 3597–607.
- Lu, S.; Lyngholm, L.; Yang, G.; Bronson, C.; Yoder, O. C.; Turgeon, B. G. Tagged mutations at the *Tox 1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. . *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91 (1994) 12649–53.
- Maier, F.J.; Schäfer, W. Mutagenesis via insertional-or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biological Chemistry* 380 (1999) 855-64.
- Manivasakam, P.; Schiestl, R. H. Nonhomologous end joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (1998) 1736–45.

- Marchi, C. E.; Brommonschenkel, S. H.; Queiroz, M. V.; Mizubini, E. S. G. Integration of pAN7.1 into the *Magnaporthe grisea* genome mediated by restriction enzyme. *Fitopatologia brasasileira* 31 (2006) 254-60.
- Marion, C. L.; Rappleye, C. A.; Engle, J. T.; Goldman, W. E. An α -(1,4)-amylase is essential for α -(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum* *Molecular Microbiology* 62 (2006) 970–83.
- Moore, J. K.; Haber, J. E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16 (1996) 2164–73.
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258 (1992) 607-14
- O’Connell, R.J.; Bailey, J.A.; Richmon, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum* *Physiological Plant Pathology* 27 (1985) 75-98.
- Ochocka, A. M.; Pawelczyk, T. Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C and their role in signal transduction in the cell *Acta Biochimica Polonica* 50 (2003) 1097–1110.
- Pao, S. S.; Paulsen, I. T.; Saier, M. H. Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 1–34.
- Parisot, D.; Dufresne, M.; Veneault, C.; Laugé, R; Langin, T. *clal*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetic Genomics* 268 (2002) 139-51.
- Pellier, A.L.; Laugé, R.; Veneault-Fourrey, C.; Langin, T. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulador of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology* 48 (2003) 639-55.
- 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) 117-24.
- Redman, R. S.; Ranson; J. C.; Rodriguez, R. J. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (1999) 969–75.
- Redman, R. S.; Rodriguez, R. J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology* 18 (1994) 230-46.

- Rhee; S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C Annual Review of Biochemistry 70 (2001) 281-312.
- Rizo, J.; Südhof, T.C. C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. J. Biol. Chem. 273 (1998) 15879–82.
- Rodriguez, R.J.; Yoder, O. C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*) Gene,54(1987) 73-81.
- Sanger, F., Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 74(1977) 5463–67.
- Schiestl, R. H.; Petes, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88 (1991) 7585-9.
- Shannon, K. W.; Rabinowitz, J. C. Isolation and Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *MIS1* Gene Encoding Mitochondrial C1-Tetrahydrofolate Synthase J. Biol. Chem. 263 (1988) 7717-25.
- Shen, L.; Zhengyi, W.; Pengjuan L.; Debao, L. A Gy subunit promoter T-DNA insertion mutant—A1-412 of *Magnaporthe grisea* is defective in appressorium formation, penetration and pathogenicity 51 (2006) 2214-18.
- Shi, Z.; Christian, D.; Leung, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. Phytopathology 85 (1995) 329–33.
- Soares, M.A. Transformação e mutagênese insercional em *Penicillium griseoroseum* por REMI (integração mediada por enzima de restrição) (Dissertação de Mestrado). (2002) Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.
- Souza, C. C.; Goldman, M. H. S.; Goldman; G. H. Tagging of genes involved in multidrug resistance in *Aspergillus nidulans*. Molecular General Genetic 263 (2000) 702:711.
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C.: A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. Anal Biochem 119 (1982) 158-63.
- Sugiura, T.; Nagano, Y.; Inoue, T.; Hirotani, K. A novel mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthetase is upregulated in human colon adenocarcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 315 (2004) 204-11.
- Sweigard, J.A.; Carroll, A.M.; Farrall, L.; Chumley, F.G.; Valent, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions 11 (1998) 404-12.

- Takano, Y.; Takayanagi, N.; Hori, H.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, T.; Kimura, A.; Okuno, T. A gene involved in modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of *Colletotrichum lagenarium* *Molecular Microbiology* 60 (2006) 81–92.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-80.
- Thon, M. R.; Nuckles, E. M.; Vaillancourt, L. J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (2000) 1356–65.
- Van Dijken, P.; Van Haastert, P. J. M. Phospholipase C δ regulates germination of *Dictyostelium* spores *BMC Cell Biology* 2 (2001) 25.
- Van de Rhee, M. D.; Graça, P. A. M.; Huizing, H. J.; Mooibroek, H. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics* 250 (1996) 252-8.
- Veneault-Fourrey, C.; Parisot, D.; Gourges, M.; Laugé, R.; Lebrun, M. H.; Langin, T. The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Genet Biol.* 42 (2005) 306-18.
- Voegele, R.T.; Struck, C.; Hahn, M.; Mendgen, K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98 (2001) 8133–38.
- Wang, J.; Holden, D. W.; Leong, S. A. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85 (1988) 865-69.
- Wirsel, S.G.; Voegele, R.T.; Mendgen, K.W. Differential regulation of gene expression in the obligate biotrophic interaction of *Uromyces fabae* with its host *Vicia faba*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14 (2001) 1319–26.
- Weinglass, A.B.; Kaback, H.R. The central cytoplasmic loop of the major facilitator superfamily of transport proteins governs efficient membrane insertion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 8938-43.
- Wijesundera, R.L.C.; Bailey, J.A.; Byrde, R.J.W.; Fielding, A.H. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose . *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34(1989) 403-13.

Zhu, J.; Schiestl, R. H. Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (1996) 1805–12.

CAPITULO II

O REGULADOR TRANSCRICIONAL PacC INFLUENCIA A PATOGENICIDADE DE *Colletotrichum lindemuthianum*

1. RESUMO

O pH extracelular é um importante fator abiótico capaz de induzir a expressão diferencial de genes em diversos microrganismos. A cascata de sinalização tem início com a percepção do pH extracelular alcalino e termina com a ativação do fator de transcrição PacC, capaz de induzir a expressão de alguns genes em pH alcalino e reprimir aqueles preferencialmente expressos em pH ácido. Um cDNA, identificado em um banco de EST de *C. lindemuthianum*, que codifica o fator de transcrição PacC (*pacCl*, *pacC* de *Colletotrichum lindemuthianum*), foi sequenciado e analisado. Ele codifica uma proteína deduzida de 581 aminoácidos. Esta proteína é denominada PacCl e possui alta similaridade de aminoácidos com proteínas da família de reguladores de transcrição PacC/Rim101 de fungos filamentosos e leveduras. A região N-terminal possui três motivos Dedo de Zinco, do tipo Cys₂Hys₂, caracterizados quanto à capacidade de ligação ao DNA e presentes em todas as proteínas PacC/Rim101. O gene *pacCl* tem reduzida transcrição em pH ácido como 3,0 e 4,0, mas sua transcrição é ativada mediante a elevação do pH extracelular. O crescimento da linhagem mutante, contendo *pacCl* interrompido, foi limitado em pH alcalino e a produção de lipase extracelular foi reduzida em relação à linhagem selvagem. Além de sua importância para o crescimento normal em pH alcalino e produção de lipase, *pacCl* é necessário à patogênese. O mutante é capaz de germinar, desenvolver apressórios melanizados e funcionais e, conseqüentemente, penetrar o tecido hospedeiro por meio da diferenciação de hifas primárias. Entretanto, este não foi capaz de causar maceração do tecido vegetal infectado, pois, não desenvolveu hifas secundárias e não foi capaz de concluir o ciclo de reprodução assexuada na planta. Os transcritos de *pacCl* foram detectados por RT-PCR na linhagem selvagem, 18h após a inoculação de plantas de feijoeiro e aumentou, progressivamente, com a biomassa fúngica durante a cinética de infecção. Outros dois cDNA's, codificando proteínas homólogas às proteínas das famílias PalA/Rim20 e PalF/Rim8 de fungos e leveduras, também foram identificados no banco de EST. Estes resultados demonstram que o mecanismo de regulação da expressão de genes mediado pelo pH extracelular, assim como ocorre em outros fungos e leveduras, também está presente em *C. lindemuthianum*. Os resultados sugerem que PacCl é um regulador da ativação de genes, cuja expressão é necessária para o crescimento do fungo em condições alcalinas, assim como para a transcrição de genes necessários à passagem da fase

biotrófica para a necrotrófica, influenciando a virulência de *C. lindemuthiaum*. A detecção de genes regulados positivamente por PacCl, na transição da fase biotrófica para a necrotrófica, poderá auxiliar o entendimento dos mecanismos moleculares, que levam à esta transição em fungos hemibiotróficos e, conseqüentemente, à proposição de estratégias para controle da doença.

2. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é atacado pelo fungo filamentosso *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magnus) Briosi & Cavara, que ocasiona a doença conhecida como antracnose, podendo levar a grandes perdas na produtividade, principalmente em regiões onde as condições climáticas favorecem o crescimento e dispersão deste fitopatógeno. *Colletotrichum lindemuthianum* possui duas fases durante o processo de infecção, sendo uma inicial assintomática, chamada de fase biotrófica, durante a qual o fitopatógeno se estabelece no tecido hospedeiro, seguida por uma fase destrutiva que leva à maceração do tecido (O'Connell et al., 1985; Latune-Dada, 2001). Inicialmente, o patógeno invade a primeira célula hospedeira pela diferenciação de um apressório melanizado, fortemente, aderido à cutícula. Na região de contato entre o apressório e a cutícula, a parede dessa estrutura é mais fina e possui pouco depósito de melanina, justamente, no local que irá diferenciar o peg de penetração, que romperá a camada de cutícula e a parede celular vegetal. O peg se diferenciará em uma vesícula de infecção, quando atingir o lúmen da célula hospedeira. Após 24h da deposição dos conídios sobre as folhas, hifas primárias surgirão a partir dessa vesícula de infecção e crescerão entre a parede celular vegetal e a plasmalema, não ocasionando, a morte da célula hospedeira e caracterizando a fase biotrófica. Hifas secundárias mais finas e ramificadas do que as hifas primárias serão diferenciadas e, nesse estágio, as células vegetais serão mortas, o que macroscopicamente coincide com o aparecimento de lesões marron-escuras, sintomas típicos da antracnose que serão visualizados quatro ou cinco dias após a inoculação. Nesta fase, o patógeno nutre-se de compostos lançados pelas células mortas e pela degradação da parede celular pela ação de enzimas secretadas pelas hifas, caracterizando a fase necrotrófica.

Normalmente, a fase necrotrófica é caracterizada pela secreção de enzimas relacionadas com a degradação da parede celular de plantas, tais como endopoligalacturonases, pectinas liases, celulasas e proteases (Cooper, 1983). Em fungos fitopatogênicos como *Colletotrichum* ssp. (Wattad et al., 1997), *Aspergillus flavus* (Brown et al., 1992) e *Cryphonectria parasitica* (Gao & Shain, 1995), essas enzimas são consideradas fatores de virulência. Normalmente, os genes que codificam as enzimas relacionadas com a degradação dos constituintes da parede celular vegetal sofrem repressão catabólica (Cooper, 1983). Porém, outros fatores são

igualmente importantes no controle da expressão das mesmas, tais como fonte de nitrogênio, temperatura, pH e o tipo de nutrição realizada pelo patógeno no início da infecção (Malvessi & Silveira, 2004; Shih et al., 2000; Gómez-Gómez et al., 2002).

O pH ambiental interfere com a patogenicidade ou virulência de fungos fitopatogênicos por influenciar a secreção de diversas enzimas ou metabólitos importantes no processo infeccioso. Esses efeitos são bem evidentes no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (St. Leger et al., 1998) e em fitopatogênicos, como: *Colletotrichum gloeosporioides* (Yakoby et al., 2000; Drori et al., 2003; Kramer-Haimovich et al., 2006), *Botrytis cinerea* (Manteau et al., 2003) e *Colletotrichum* spp. (Maccheroni et al., 2004).

A ativação ou a repressão de genes, induzidas pelo pH do meio extracelular, são controladas pelo fator de transcrição do tipo dedo de Zinco Cys₂His₂ denominado PacC. O gene que codifica essa proteína foi, primeiramente, isolado em *A. nidulans* (Tilburn et al., 1995), mas a presença de ortólogos tem sido descrita também em *Aspergillus niger* (MacCabe et al. 1996), *Fusarium oxysporum* (Caracuel et al., 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001), *Fusarium verticillioides* (Flaherty et al., 2003), *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal & Ruiz Herrera, 2005), *Crinipellis pernicioso* (Gilvan Ferreira – comunicação pessoal) e nas leveduras *Yarrowia lipolytica* (Lambert et al., 1997) e *Candida albicans* (Ramon et al., 1999), nas quais a proteína recebe o nome de Rim101.

Em ambientes alcalinos, PacC ligando-se à seqüência consenso 5'GCCARG3', presente em promotores de genes cuja transcrição ocorre preferencialmente e, ou exclusivamente em pH alcalino (denominados neste trabalho como genes alcalinos), funciona como um ativador da transcrição dos mesmos, inclusive do seu próprio gene. Em pH alcalino, a transcrição de genes, cujas proteínas são funcionais em pH ácidos (chamados de genes ácidos), torna-se dispendiosa para a célula. A proteína PacC também liga-se aos promotores dos genes ácidos, que apresentam a seqüência de ligação deste fator de transcrição na região de seus promotores inibindo a sua transcrição por competição com os ativadores transcricionais específicos desses genes.

Obviamente, as células necessitam de uma via de transdução de sinal, que seja capaz de perceber as variações de pH externo e, conseqüentemente, ativar a proteína PacC. Em *A. nidulans*, seis genes são responsáveis pela cascata de sinalização ativada por pH, os quais, foram denominados como *palA*, *palB*, *palC*,

palF, *palH* e *palI* (Arst & Penalva, 2003). A função da proteína PalC ainda não foi determinada; no entanto, seu papel na via de sinalização é indiscutível devido ao fenótipo apresentado pelos mutantes obtidos. PalH e PalI são proteínas com sete e quatro domínios transmembranas, respectivamente. PalH é, possivelmente, o sensor da variação do pH extracelular (Negrete-Urtasun et al., 1997; Herranz et al., 2005), sendo que, neste processo, possivelmente ele seja auxiliado pela proteína PalI (Peñalva & Arst, 2004, Herranz et al., 2005). PalF é uma proteína da família das arrestinas, contendo dois desses domínios, que interagem com a região C-terminal de PalH (Herranz et al., 2005). Em pH alcalino, a interação de PalH com PalF é favorecida, acarretando sua fosforilação e ubiquitinação independente de PalA, PalB e PalC. Existem algumas evidências que PalF fosforilado e ubiquitinado estaria envolvido com tráfico de vesículas endocíticas.

PalA liga-se à região C-terminal de PacC, por meio de dois motivos YPX(L/I) presentes em PacC e que ladeiam o sítio de sinalização da protease, requerido para a primeira clivagem de PacC. Esta etapa de ligação PalA/PacC, dependente de pH alcalino, permite a ação de PalB no sítio de sinalização da protease. PalB é uma protease cisteína, que remove cerca de 180 resíduos de aminoácidos da região C-terminal de PacC, originando uma forma denominada como aberta PacC⁵³, contendo aproximadamente 500 aminoácidos e uma massa molecular de 53 kDa. Um segundo processamento proteolítico, independente de PalB e do pH, ocorre na região C-terminal de PacC⁵³, resultando um peptídeo menor, com massa molecular 27 kDa, contendo 252 a 254 aminoácidos, chamado PacC²⁷. Tanto PacC⁵³ quanto PacC²⁷ são encontrados no núcleo da célula, mas somente a forma PacC²⁷ é funcional (Fernández-Martínez et al., 2003).

Mutações no gene *pacC* interferem em diferentes processos celulares, tais como conidiação, sistema de reprodução, filamentação, produção de enzimas, resistência a estresses ambientais e patogenicidade (Tilburn et al., 1995, MacCabe et al., 1996; Aréchiga-Carvajal et al., 2005).

Quando analisamos a influência de PacC/Rim101 na patogenicidade ou virulência em diferentes fungos e leveduras patogênicos podemos concluir que o papel dessa família de fator de transcrição é espécie-específica. Os fenótipos observados podem ser agrupados em três conjuntos. No primeiro grupo, estariam reunidos os fungos e leveduras nas quais genes de virulência não estão sob o controle do fator de transcrição PacC/Rim101, como é o caso de *U. maydis* (Aréchiga-

Carvajal et al., 2005). O segundo grupo reuniria organismos cujos fatores de virulência são ativados pelo fator de transcrição PacC/Rim101, como *A. nidulans* (Bignell et al., 2005), *S. sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001; Rollins, 2003) e *C. albicans* (Davis et al., 2000). O terceiro grupo seria formado por espécies, nas quais PacC/Rim101 atuaria como um repressor de genes de virulência, conforme observado em *F. oxysporum* (Caracuel et al., 2003).

Neste trabalho, foram identificados genes ortólogos aos genes *pacC/RIM101*, *palA* e *palF* num banco de EST de *C. lindemuthianum*. Foi demonstrado que o gene *pacCl* é expresso, preferencialmente, em meios com valores de pH mais elevados. O seu papel na virulência e na expressão de possíveis fatores de virulência, foi determinado, por meio da análise de uma linhagem mutante nula para o gene *pacCl*. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que PacC é um ativador transcricional necessário para a total virulência de *C. lindemuthianum*, pois ele ativa genes importantes durante a infecção para a colonização eficiente do hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

O fungo *C. lindemuthianum*, isolado UPS9, foi utilizado como linhagem selvagem em todos os experimentos. A cultivar de feijoeiro susceptível La Victoire foi usada nos experimentos de patogenicidade e a cultivar resistente Jalo foi usada, juntamente com La Victoire, para medida do pH apoplástico nas folhas de feijoeiro. Transformantes foram obtidos a partir da transformação do isolado UPS9 e mantidos à temperatura de 21°C em meio ágar-malte, conforme descrito em Parisot et al. (2002).

O crescimento radial nos valores de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 foi determinado pela medida do diâmetro da colônia, crescendo em meio MS3 (MgSO₄.7H₂O 2,5g; KH₂PO₄ 2,7g; peptona 1g; extrato de levedura 1g; sacarose; ágar 15g 10g L⁻¹) tamponado com tampão fosfato de sódio-ácido cítrico (50 mM). Placas de Petri foram inoculadas no centro com discos de 7 mm, retirados da margem da colônia das linhagens de interesse que cresciam em meio MS3, e mantidas a 21°C. Duas medidas do diâmetro foram obtidas em intervalos de dois dias. Cinco repetições foram feitas, para cada valor de pH e o experimento foi repetido três vezes.

Para a extração de DNA total e RNA total, os conídios foram inoculados em meio MS3 líquido (tamponado, quando necessário) mantido a 23°C, durante 48h com rotação de 150 rpm. Após o crescimento, o pH do meio de cultura foi medido e o micélio foi lavado em água destilada, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C.

3.2. Extração de ácidos nucléicos

Plasmídeos, propagados em *E. coli* DH5 α , foram extraídos, utilizando-se o kit QIAprep Spin (Qiagen, Hilden, Alemanha). A extração do DNA total de *C. lindemuthianum* foi realizada conforme descrito por Specht et al. (1982).

O RNA total foi extraído do micélio usando-se o reagente Extract-All (Eurobio, Lês Ulis, França). O RNA total das folhas de feijoeiro, inoculadas com o isolado UPS9, foi obtido empregando-se o método de extração com fenol quente. Quatro folhas foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. O tecido vegetal macerado foi, então, transferido para um tubo contendo 5 mL de tampão de extração (Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM; LiCl 100 mM; EDTA 10

mM e SDS 1%) e 5 mL de fenol pré-aquecido a 80°C. Após homogenização, 5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1 vol/vol) foi adicionado ao tubo de ensaio. Após 15 min de centrifugação a 9250 g, a fase aquosa foi removida e um volume de LiCl 4 M foi adicionado. Após 10 min em incubação a -70°C, o RNA foi recuperado por centrifugação a 9250g durante 15 min. O RNA precipitado foi redissolvido em 1 mL de água tratada com DEPC e quantificado por espectrofotometria.

3.3. Isolamento dos clones de cDNA

Os clones de cDNA, obtidos no vetor pBK-CMV (Stratagene), foram provenientes de uma biblioteca de cDNA contendo os terminais 5' seqüenciados. Essa biblioteca foi obtida a partir do micélio de *Colletotrichum lindemuthianum* crescido em meio líquido, com carência de nitrogênio, construída pelo laboratório LLPM do Instituto de Biotecnologia de Plantas da Universidade Paris XI, França (Dufresne, 1997). A confirmação dos clones foi realizada por meio de seqüenciamento dos clones previamente selecionados.

3.4. Construção do vetor de inativação

Produtos de amplificação obtidos por PCR do DNA genômico e RT-PCR do RNA total de *C. lindemuthianum* com o par de oligonucleotídeos Opac1/Opac3 (Tabela 1) foram clonados no vetor TOPO[®] TA cloning (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, resultando nos plasmídeos pPacgen e pPactr, respectivamente. Esses plasmídeos foram seqüenciados posteriormente.

Um fragmento de DNA resultante da clivagem do cDNA com *EcoRI* foi subclonado no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene[®]), originando o plasmídeo denominado pBSKpac. Esse plasmídeo foi usado na construção do vetor de inativação, utilizando-se o sistema de mutagenese GPS[™]-M (New England Biolabs). Este sistema permite inserir um elemento transponível, denominado “transprimer” e presente no vetor doador, em uma seqüência de DNA-alvo pela transposição *in vitro*. Utilizou-se como doador, o plasmídeo pGPS3.Hygro-Amp (gentilmente cedido por Marc-Henri Lebrun - CNRS Bayer Cropscience), que contém o gene de resistência à higromicina e canamicina dentro da seqüência do transposon. A reação de transposição foi feita, de acordo com o protocolo do kit GPS[™]-M. Foram misturados 40 ng do vetor doador pGPS3.Hygro-Amp e 60 ng do receptor pBSKpac juntamente com a transposase TnsABC. Após a reação de transposição, a enzima de restrição PI-

SceI foi utilizada para destruição do vetor doador. Os produtos da reação de transposição foram utilizados para transformar células ultracompetentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen), posteriormente semeadas em meio contendo canamicina. Clones de interesse foram selecionados por PCR com os conjuntos de oligonucleotídeos Opac1/N e Opac1/S (Tabela 1) e confirmados, empregando-se o conjunto de oligonucleotídeos Opac1/Opac2 (Tabela 1) com as condições sugeridas pelo fabricante do kit GPSTM-M. Dessa seleção obteve-se o plasmídeo pBKSpac::hph2 que, posteriormente, foi utilizado para interrupção do gene *pacCl* em *C. lindemuthianum*. Determinou-se o local de inserção do transposon, que foi empregado na construção do vetor de inativação nos clones selecionados, utilizando-se os oligonucleotídeos N e S (Tabela 1) para o seqüenciamento.

3.5. Obtenção dos mutantes *pacCI*

O vetor construído neste trabalho, pBKSpac::hph2, que contém o gene que confere resistência à higromicina, interrompendo um fragmento do cDNA do gene *pacCl*, foi utilizado nos experimentos de transformação da linhagem UPS9 de *C. lindemuthianum*. O micélio, crescido em GPYECH (Ansari et al., 2004).líquido durante 48 h, foi lavado e colocado em Erlenmeyer de 100 mL, contendo 20 mL de glucanex 10mg/mL em tampão fosfato 10 mM, contendo KCl 0,8 mol/L como estabilizador osmótico. Os protoplastos obtidos foram lavados 3x em solução STC (sorbitol 1 mol/L, CaCl₂ 50 mM em tampão TrisHCl 10 mM). Ao final das lavagens, os protoplastos foram ressuspensos em STC à concentração de 1×10^8 protoplastos/mL. Em um tubo, foram adicionados 200 μ L da suspensão de protoplastos, 5 μ g do vetor pAN7.1 e 50 μ L de PEG 6000 60% em STC e, em seguida, o tubo foi mantido no gelo. Após 20 min, foram acrescentados 500 μ L da solução de PEG 6000, mantendo-se o tudo à temperatura ambiente durante 20 min. Ao final desse período, os protoplastos foram plaqueados em meio BDA, contendo sacarose 0,56 mol/L como estabilizador osmótico. Após 48 h de regeneração dos protoplastos, uma nova camada de meio BDA contendo higromicina 100 μ g/mL foi adicionada às placas de Petri. Os micélios transformantes resistentes à higromicina foram transferidos para novo meio de cultivo contendo 50 μ g/mL de higromicina, sendo, posteriormente, purificados por isolamento monospórico. A estabilidade da resistência foi testada, transferindo-se, repetidamente, o transformante para meio não seletivo e passando, posteriormente, para meio seletivo contendo higromicina.

3.6. Testes de patogenicidade

Plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. La Victoire foram utilizadas como cultivar suscetível, nos ensaios de patogenicidade. As sementes foram germinadas e as plântulas de feijoeiro foram mantidas em câmara de crescimento durante sete dias. A superfície das folhas cotiledonares excisadas foi inoculada com uma suspensão 1×10^6 conídios/mL. Essas folhas foram mantidas em placas de Petri contendo discos de filtro de papel embebidos em água, sendo, então, incubadas a 19°C em câmara de luz com 8 h de escuro e 16 h de luz ($166 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Seis folhas foram utilizadas para cada linhagem transformante testada. Os sintomas foram observados cinco a sete dias após a inoculação. Os isolados que demonstraram redução na virulência ou perda de patogenicidade, foram posteriormente inoculados em plantas mantidas em casa de vegetação, para confirmação do fenótipo. Para a observação microscópica da cinética de infecção, hipocótilos excisados de feijoeiro foram inoculados com 10 μ L da mesma suspensão de conídios e mantidos sob as mesmas condições de luminosidade, umidade e temperatura.

3.7. Observação do processo infeccioso por microscopia de fluorescência

O tecido epidermal dos hipocótilos foi destacado com auxílio de um estilete, clarificado duas vezes durante 10 min em KOH 1M à 70°C e montado em K₂HPO₄ 67 mM pH 9,0, contendo azul de anilina 0,1%. As observações foram obtidas por meio de microscopia de epifluorescência em microscópio Axioskop (utilizando-se os filtros BP365, FT 395, LP397 com luz UV no comprimento de onda de 340 a 380 nm) (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as fotografias digitais foram registradas com o auxílio de câmara de vídeo (Sony, Kölen, Alemanha) acoplada ao computador.

3.8. Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências

O DNA foi seqüenciado, adotando-se o procedimento de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977), usando o kit ¹⁷Sequencing (Pharmacia Biotech S.A., Saint Quentin-en-Yvelines, Roissy, France) ou o kit ABI PRISM (Perkin Elmer, Roissy, France) e diferentes oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1).

A busca por seqüências homólogas foi realizada no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) via

programas BlastX e BlastP (Altschul et al., 1997). A tradução de seqüências foi realizada no programa Bioedit (Hall, 1999). Com o auxílio do ClustalW (Thompson et al., 1994) foi possível obter os alinhamentos de seqüências nucleotídicas e polipeptídicas, que foram, então, formatadas pelo programa Bioedit. Pesquisas por domínios conservados nas seqüências polipeptídicas foram feitas no site Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), disponibilizado pelo Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) e pelo programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). Árvores filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA3 (Kumar et al., 2004), utilizando-se seqüências depositadas no GenBank (Número de acesso nos resultados).

3.9. Análise da transcrição por meio de RT-PCR

Para estudar a transcrição dos genes *pacCl* e *clgpd* (Dufresne et al., 1998) durante o crescimento do fungo *in planta* e *in vitro*, foram realizados experimentos de RT-PCR. A primeira fita de cDNA e a amplificação da mesma em moléculas de DNA foram obtidas com o Kit SuperScriptTM II One-Step System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (INVITROGEN). As seqüências dos oligonucleotídeos, utilizados em cada experimento de RT-PCR, estão representadas na Tabela 1. Os pares de oligos Opac1/Opac2 e Ogpd1/Ogpd2 foram utilizados para detecção dos transcritos *pacCl* e *clgpd*, respectivamente. Foram utilizados 100 ng de RNA total, tratados com DNAase, como matriz para a síntese do cDNA em todos os experimentos de RT-PCR. A síntese da primeira fita de DNA foi realizada, segundo instruções do fabricante. A amplificação dessa fita foi feita com as seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 94°C durante 15s, anelamento a 50°C durante 30s e extensão a 68°C durante 1 min. No final, um passo de extensão a 68°C durante 5 min foi realizado. Para verificar a transcrição do gene *palACI*, os oligonucleotídeos Ortpala1/Ortpala2 foram utilizados no RT-PCR com as mesmas condições de amplificação para *pacCl*.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em experimentos de seqüenciamento e RT-PCR.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' →3')
R	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGC
F	CGTGCACGAAGACGGGGGTTCCC
N	ACTTTATTGTCATAGTTTAGATCTATTTTG
S	ATTAATCCTTAAAACTCCATTTCCACCCCT
Opac1	AAGCGCCCCCAGGACTTGAAGAAGC
Opac2	CTCAAAGATGATGGGCGACCTGGGC
Opac3	CGACGCTTAGCGTGGGCGAAGAAGT
Ogpd1	CGCTGTGAGCACCCCGACG
Ogpd2	GCCTTGGCCTTGTCGATGGTGG
Ohph3	GAGATGCAATAGGTCAGGCTCTCGCTG
Ohph4	AAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC
Ortpala1	GCCAACATGGCAGTTTCCAAGGTGC
Ortpala2	CGAGAGCTTGCAGTGAGCCGGGCAGG
Opala3	CTGCCCCACAGCTTGGTGCATCA
Opala4	CAGCGGGTCAACCGGAGT
Opalf2	CGACAAGGCCGCCCTCGCCGA

3.10. Detecção dos transcritos por *Northern Blot*

Amostras contendo 20 µg de RNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose, contendo formaldeído e eluídos para membrana de nylon N⁺ (Amersham França AS, Les Ulis, França) por capilaridade (Sambrook et al., 1989). Hibridizações foram feitas, como previamente descritas (Dufresne et al., 1998). Fragmento do gene *pacCl*, obtido por PCR com o conjunto de oligonucleotídeos Opac1/Opac2 (Tabela 1), foi utilizado como sonda. Para o gene *clgpd*, o produto de PCR obtido com os oligonucleotídeos Ogpd1/Ogpd2 foi marcado e utilizado com sonda. As sondas foram marcadas com ³²P, utilizando-se o kit de marcação de DNA Ready-To-Go (Pharmachia Biotech S.A., Saint Quentin-en-Yvelines, França).

3.11. Influência do *pacCl* na produção e secreção de lipase

Ensaio foram feitos em meio sólido, contendo 1,5% de ágar ou meio líquido (peptona, 10g; NaCl, 5g, CaCl₂.2H₂O, 0,1, tween 20, 10mL, H₂O 100mL). O corante

bromocresol púrpuro (25 mg/L) foi utilizado, somente, em meio sólido. Placas foram inoculadas, no centro, com discos de 7 mm retirados da margem da colônia, crescendo em meio M3S, e mantidas a 21°C. Após sete dias, as placas foram colocadas em geladeira para evidenciar o halo, contendo sais de Ca⁺² precipitado. A atividade enzimática foi estimada, utilizando-se um índice enzimático (I) que expressa a relação entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio da colônia.

Meio de cultura líquido foi utilizado para medir a quantidade de lipase, produzida pelas linhagens de *C. lindemuthianum*. Frascos contendo 50 mL de meio de cultura foram inoculados com 1 mL de uma suspensão de conídios, contendo 10⁷ conídios/mL, mantidos sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 21°C. Após 8 dias, o sobrenadante da cultura foi retirado e a quantidade de lipase foi estimada, utilizando-se o kit de dosagem de lipase do laboratório Bioclin.

3.12. Medida do pH apoplástico na folhas de feijoeiro da cultivar susceptível La Victoire e da cultivar resistente Jalo

Para cada experimento, 10 folhas foram utilizadas. Essas folhas foram completamente imersas em Béquer, contendo 100 mL de água milliQ. O Béquer contendo as folhas foi mantido sob vácuo e, após 15 min, o vácuo foi desfeito lentamente, para propiciar infiltração no apoplasto. Em seguida, o excesso de água superficial foi retirado das folhas. Seringas foram preenchidas com essas folhas e colocadas em tubos falcon. O líquido obtido, após 5 min de centrifugação a 4000 g, foi coletado e o pH medido em pHmetro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do cDNA do *pacCl*

Após uma pesquisa nos dados de seqüências 5' de cDNA, contidas no banco de EST, selecionou-se o clone identificado como UPA1P4_B11_BKR. O seqüenciamento completo deste clone foi realizado, utilizando-se os oligonucleotídeos F, R, Opac1, Opac2 e Opac3 (Tabela 1). Uma seqüência de 2.486 pb foi obtida e uma ORF de 1.746 pb foi identificada e traduzida em um polipeptídeo putativo de 581 aminoácidos (aa's) (Figura 1). Esta proteína possui ponto isoelétrico (pI) teórico de 9,1 e 64,11 kDa de massa molecular. Dois íntrons foram identificados a partir do seqüenciamento do fragmento de PCR, amplificado a partir do DNA genômico, utilizando-se os oligonucleotídeos Opac1 e Opac2 (Figura 1).

A seqüência primária de aminoácidos tem alta similaridade com o grupo de proteínas da família de fatores de transcrição PacC/Rim101, identificados em *A. nidulans* (Tilburn et al., 1995), *A. niger* (MacCabe et al., 1996), *F. oxysporium* (Caracuel et al., 2003), *S. sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001), *Y. lipolytica* (Lambert et al., 1997) e *C. albicans* (Ramon et al., 1999). A maior identidade (83%) e similaridade (87%) de aminoácidos desta seqüência foi com a proteína PacC/RIM1 de *Glomerella acuntata* (ABL96218.1). A proteína de *C. lindemuthianum* foi nomeada PacCl e seu gene codificador como *pacCl* (*Colletotrichum lindemuthiaanum-pacC*).

O códon de iniciação-ATG está presente na seqüência 5'CACCATGTC3', similar àquela no início da tradução em outros fungos filamentosos (Gurr et al., 1987) e inclui o importante resíduo -3 A da seqüência consenso de Kozak (CAMMATGNC) (Kozak, 1984). Em eucariotos, o complexo protéico responsável pela poliadenilação reconhece o elemento AAUAAA no RNAm (revisado por Shatkin & Manley, 2000). Esta seqüência não foi detectada na região 3' não codificadora do *pacCl*, mas seqüências situadas a +202 (AAATA) e +93 (TTTCACAGC) do códon de parada possuem similaridade com elementos de poliadenilação, descritos para outros fungos (Ballance, 1986). Outras sete seqüências, relacionadas ao término da tradução, foram detectadas nas posições +10, +28, +194, +222, +282, +308 e +340 (Figura 1) (Unkles, 1992). O gene *pacCl*

possui, no mínimo, dois íntrons identificados a partir da análise da seqüência do fragmento de PCR, obtido da amplificação do DNA genômico.

O que caracteriza a família de proteínas PacC/Rim101 como fator transcricional é a presença de três motivos, denominados Dedo de Zinco (DZ), na região N-terminal (Jr Arst & Penalva, 2003). A proteína deduzida de 581 aminoácidos possui este domínio (Figura 2). A presença do domínio DZ é fundamental para a atividade desta enzima. Este domínio tem, como função, reconhecer e ligar-se a seqüências específicas de nucleotídeos, presentes na região promotora de diferentes genes, atuando tanto como ativador quanto repressor da transcrição dos mesmos de forma pH-dependente (Espeso & Arst, 2000; Fernández-Martínez et al., 2003). Em *A. nidulans*, PacC liga-se especificamente a genes, que apresentam a seqüência consenso 5'GCCARG3', com uma preferência para T na posição -1, nos seus promotores (Tilburn et al., 1995; Espeso & Arst, 2000).

De acordo com características estruturais deste domínio, os três DZ presentes no N-terminal de PacCl são do tipo Cys₂His₂, e foram nomeados de c1DZ1, c1DZ2 e c1DZ3. Dedos de Zinco do tipo Cys₂His₂ possuem a seqüência consenso CX₂₋₄CX₁₂HX₃₋₅H conservada (Jacobs, 1992), em que C e H representam os resíduos de cisteína e histina, respectivamente e X representa qualquer aminoácido (Figura 2).

O alinhamento de aminoácidos da região correspondente ao DZ demonstra que esta região é, altamente, conservada na família PacC/Rim101, principalmente entre os ascomicetos do grupo Pezizomicotina (Figura 3). As regiões, que separam DZ1 de DZ2 e DZ3 de DZ4, são conservadas em todos os ascomicetos filamentosos analisados no alinhamento, exceto a substituição de prolina conservada na posição 68 por leucina na proteína PacC de *Aspergillus parasiticus*. Em *A. nidulans*, a substituição deste resíduo de prolina por leucina reduz a capacidade do DZ de ligar-se ao DNA, assim como outras substituições resultam em alteração na estabilidade da proteína, na capacidade de ligar-se ao DNA, ou mesmo na localização nuclear de PacC (Fernández-Martínez et al., 2003). Determinou-se, por meio de substituições, que 17 resíduos na região dos três DZ são importantes para a funcionalidade do domínio DZ em PacC de *A. nidulans* (Espeso et al., 1997; Fernández-Martínez et al., 2003). Verificando o alinhamento desta região, observa-se a conservação de 11 desses resíduos em diferentes fungos filamentosos e leveduras, sendo que 15 foram conservados quando foi comparado apenas o grupo Pezizomicotina (Figura 3). O espaçamento entre os resíduos de Cys-Cys e His-His em PacCl, assim como nas

demais proteínas alinhadas, é conservado no consenso (c1DZ1:C₄C, H₄H; c1DZ2: C₄C, H₃H e c1DZ3: C₂C, H₃H) (Figura 3).

O motivo DZ1 apresentou menor conservação dos resíduos de aminoácidos que os demais dedos de zinco (Figura 3). Na proteína PacC de *A. nidulans*, DZ1 não participa da ligação ao DNA, mas contribui para a estrutura funcional do mesmo, estabilizando DZ2 (Fernández-Martínez et al., 2003). O c1DZ1 possui o resíduo de triptofano (W) na posição C3 (numerado a partir do primeiro resíduo de Cys), que pode estabelecer uma interação hidrofóbica com outro resíduo W na posição equivalente no c1DZ2, de forma a estabilizar este domínio. A presença dos resíduos W e a conservação de sua localização em diferentes proteínas PacC/Rim101 evidencia a importância de sua função (Figura 3).

Ao contrário do primeiro dedo de zinco, DZ2 e DZ3 são necessários para a ligação, reconhecimento e localização nuclear da proteína PacC de *A. nidulans*. Os aminoácidos presentes nos motivos de alfa hélice destes dois dedos de zinco são os principais responsáveis pela especificidade de reconhecimento da sequência de DNA (Fernández-Martínez et al., 2003). Mutagênese sítio direcionada em *A. nidulans* demonstrou a importância da histidina no DZ2 e nos resíduos de glutamina e lisina no DZ3, para a ligação e reconhecimento da sequência 5'GCCARG3' de DNA (Espeso et al., 1997).

A sequência de aminoácidos no DZ3 é, completamente, conservada (Figura 3). Este dedo de zinco em PacC de *A. nidulans* possui um motivo de localização nuclear, tipicamente, monopartido na sua região de alfa hélice, cuja sequência consenso na família PacC/Rim101 é KKH(V/L)KT (Figura 3). Após a análise do alinhamento, pode-se concluir que, entre os Pezizomicotina, a estrutura primária deste motivo é conservada em todas as proteínas PacC, diferentemente do observado nas sequências de leveduras e basidiomicetos. Esse motivo é suficiente para direcionar a PacC²⁷ para o núcleo das células, sendo que o resíduo de lisina presente no mesmo é, altamente, necessário à sua função (Fernández-Martínez et al., 2003). Apesar dos resíduos de histidina e fenilalanina estarem em outras regiões do DZ3, eles contribuem para a estabilização estrutural necessária à funcionalidade do motivo NLS presente na alfa hélice (Fernández-Martínez et al., 2003). A alfa hélice do DZ3 possui sequências de aminoácidos, que se sobrepõem e realizam funções diferentes, uma relacionada ao reconhecimento e ligação a cis elementos específicos nos

promotores, enquanto a segunda direciona a proteína processada, PacC²⁷, para o interior do núcleo.

O alinhamento de toda a sequência de proteínas PacC/Rim101 demonstra, claramente, regiões conservadas, além do domínio DZ (Figura 4). As regiões denominadas A, B e C são funcionalmente importantes, pois, interagem intramolecularmente, evitando o processamento dependente de pH de PacC (Espeso & Arst, 2000). A região de sinalização da protease (SP) é necessária para a correta clivagem, provavelmente, realizada pela proteína PalB na estrutura de PacC⁷², originando a forma PacC⁵³, passível de ser processada por uma segunda clivagem proteolítica independente de pH e não catalisada por PalB (Diez et al., 2002). É encontrada uma quarta região denominada X, localizada entre as regiões B e SP e presente na região C-terminal, mas não há relatos de sua função nas proteínas PacC/Rim101. Estas regiões são conservadas, apenas, nos fungos Pezizomicotina, havendo pouca similaridade ou identidade nos Basidiomicetos e Leveduras.

Outros dois prováveis motivos de localização nuclear (NLS), do tipo bipartido, foram encontrados em PacCl por meio do programa PSORT II (Figura.2). O sinal de localização nuclear bipartido é caracterizado por um conjunto de aminoácidos básicos separados por, aproximadamente, 10 resíduos de um segundo conjunto, composto por três resíduos básicos, pelo menos, cuja sequência consenso é (K/R)₂-X₁₀₋₁₂-(K/R)₃ (Nigg, 1997). O primeiro motivo bipartido identificado foi **KRAFD MVDDFFAHAKRR**, localizado na região conservada A (Figura 4). PacC de *A. nidulans* possui o motivo **KKRGYDALNEFFGDLKRR** na mesma região e, possivelmente, é funcional na forma PacC⁵³ (Fernández-Martínez et al., 2003).

O segundo motivo **RRLSGTQLDSNERRR**, provavelmente, não está envolvido com o transporte da proteína para o núcleo. Ele está presente no sítio de sinalização de clivagem da protease em PacC⁷² (Figura 2 – caixa cinza SP). Na sequência de Pac⁵³, portanto, esse motivo é eliminado após a clivagem pela protease PalB. Após o processamento de Pac⁵³ pela segunda clivagem proteolítica, o NLS1 é eliminado, resultando na forma funcional Pac²⁷.

Assim como PacC de *A. nidulans* (Tilburn et al., 1995) e outras proteínas que ligam-se ao DNA, PacCl contém vários motivos consenso (S/T)PXX, que medeiam a interação proteína-DNA (Suzuki, 1989), sendo 11 motivos SPXX e 4 TPXX (Figura 2).

Foram encontrados em PacCl, similarmente a PacC de *A. nidulans*, dois motivos, **YPNL** e **YPIL**, que interagem com proteína PalA (Figura 2) (Vincent, et al., 2003). O primeiro motivo em PacCl está inserido em uma região MYPNLP, capaz de ser reconhecida por outras proteínas com domínios SH3. PalA de *A. nidulans* liga-se aos dois motivos YPX(L/I) que flanqueiam a região de sinalização da protease em PacC⁷², sendo essa ligação requerida para a reação de clivagem por protease, originando a forma PacC⁵² (Vincent et al., 2003). Motivos de ligação a proteínas com domínio SH3 foram encontrados, sobrepondo-se aos dois motivos YPX(L/I) de PacCl (Figura 2). Em todos os Ascomicetos filamentosos, esta sobreposição ocorre, somente, no primeiro domínio de ligação a PalA (Figura 4). Vincent et al. (2003) sugere que a ligação de PalA nos seus sítios antagoniza a ligação de uma proteína, que contenha um motivo SH3 e que atue, negativamente, sobre PacC.

Os domínios conservados na proteína deduzida PacCl indicam, fortemente, que a mesma⁷⁷⁷ é homóloga às proteínas PacC/Rim101 e, portanto, *C. lindemuthianum* é capaz de regular a expressão de genes, mediada pelo pH, de forma similar ao que ocorre em outros organismos já estudados, como *A. nidulans*, por meio da proteína PacC (Arst & Penalva, 2003).

Uma árvore filogenética, que relaciona PacCl às demais proteínas ortólogas, presentes nos diferentes fungos e leveduras, foi construída por meio do método do Vizinho mais Próximo (Figura 5). A árvore reuniu os organismos em grupos, filogeneticamente relacionados ao nível de Classe e até mesmo em Ordem. PacCl está, filogeneticamente, relacionada às proteínas PacC dos fungos da Classe Soradiomicetos. Os fungos Pezizomicotina foram agrupados no mesmo ramo e, conforme observado no alinhamento, as proteínas PacC desses fungos possuem regiões bem conservadas, além do DZ.

1 cggca cga ggg caa tcg gtc ctc cac ctg cct caa gct aga acg tat
48 cca cct gca cct gca ctc acg aac act caa aac aca ccc gac cct
93 tcg atc tta ttt ccg caa cgg gtc tcg gcc gat tcc att ctt ccg
138 gcc tcc cct cac cga gcc cac cag ctc ggt caa cct cgc gaa cgc
183 cag tca aac ttc cag tca gac **acc ATG TCT** GCT AAG CAA GAA AAC
01 M S A K Q E N

228 GAG TCT TCG GGA AGC AAC TCC CCG AAG AGC AGT ACT CCC GCC CCT
8 E S S G S N S P K S S T P A P

273 TCG ACG GCC ACC AGC AAC ACC TCC CAG AGC ACC GGC GCC AAC AGC
23 S T A T S N T S Q S T G A N S


318 GCC GAG GAC AAT CTG ATT TGC AAA TGG AAC TCG TGC AAC CTC AAG
38 A E D N L I C K W N S C N L K

363 TTT GTC ACG CCC GAG GCC CTC TAC GAG CAC ATC TGC GAG CGC CAT
53 F V T P E A L Y E H I C E R H

408 GTC GGT CGC AAG AGC ACC AAC AAC CTC AAC CTC ACC TGC CAG TGG
68 V G R K S T N N L N L T C Q W

453 GCT TCC TGC AGG ACG ACG ACG GTG AAG CGT GAT CAC ATC ACC TCT
83 A S C R T T T V K R D H I T S

498 CAC ATT CGC GTC CAC GTC CCC CTC AAG CCT CAC AAG TGT GAG TTC
98 H I R V H V P L K P H K C E F

Opac1 
543 TGC GGC AAG TCC TTC AAG CGC CCC CAG GAC TTG AAG AAG CAT GTC
113 C G K S F K R P Q D L K K H V

587 **AAG gtatttcagacctcgcaaccaaccctccgccccagacagtcgactgacactactccag**
128 K

649 ACC CAC GCC GAC GAC TCT GTC CTC GTC CGA TCC CCC CAG GAC CAG GGC
129 T H A D D S V L V R S P Q D Q G

697 ATG AAC GGC TAT CGG GCG CAG CCT GGC AAG **gtatgtccagctcacaattt**
145 M N G Y R A Q P G K

748 **gcgcatccaaaggtcctctcgtttttctcccaaccagaggctaagtgtgcctccag**

801 GCT TCT TCT AGC TAC TAT GAT CAT AAT GGC CAC ATG AGG ACT AAC
155 A S S S Y Y D H N G H M R T N

846 TCG GCC GCC TTC GCG CAC CAG GCT GGG CAT GCT AGC TAC TAT GCA
170 S A A F A H Q A G H A S Y Y A

891 CCC CAA CCA TCT ACA AAC TAT GGA CTG TAC TTC AAC CAA CAA CCC
185 P Q P S T N Y G L Y F N Q Q P

936 TTG AAC CCT CCC CGA TCC GAG TAC ATT GGC CAC CAC GGC GGC TAC
200 L N P P R S E Y I G H H G G Y

981 GAC AAC CGC GCC AAA CGC GCC TTC GAC ATG GTC GAC GAC TTC TTC
215 D N R A K R A F D M V D D F F

Opac3
1026 GGC CAC GCT AAG CGT CGC CAG GTC GAC CCC ACC TCC TAC CAG CAG
230 A H A K R R Q V D P T S Y Q Q

1071 GTC GGC CGT TCT CTT CTC CCT CTT CAC GGC GCT CTC GGC CTC CAC
245 V G R S L L P L H G A L G L H

1116 ACC GGC CCC ATG CCC GGC TCC GAC TAC ATG GCC GCC CCC CCT CAG
260 T G P M P G S D Y M A A P P Q

1161 CAG CAC CCA CAC CAC CAG CAC GTC GGC CAC GGT CCC TCT GGT CCC
275 Q H P H H Q H V G H G P S G P

1206 GGC CCC CTC ACC CAG CAG TAC TAC CTG CCG CCC ATG CCC AAC GCC
290 G P L T Q Q Y Y L P P M P N A

1251 CGC ACC AAG AAC GAC CTC ATC CAG ATC GAC CAG ATC CTC GAG CAG
305 R T K N D L I Q I D Q I L E Q

1296 ATG CAG AGT ACC GTC TAC GAG AAC GCC AAC CAG GCC ACG CAT GGC
320 M Q S T V Y E N A N Q A T H G

1341 ATC CAC ATC CAC GGC CAG AAC ACC TTT GAC CTG CGC CAT AGC CCC
335 I H I H G Q N T F D L R H S P

1386 TCG CCA CCC GGC GGC CAC AGA GGA TCC ATC GCC GGT ATG TCG GTC
350 S P P G G H R G S I A G M S V

1431 AAC AAC GAC GGC TAC GGC GCC GTG TCT GCC GCA CAC ATG GCC TCG
365 N N D G Y G A V S A A H M A S

1476 CCG CTC ACC GCC ATC TCC TCC ACC GGT ACC CCC GCC GTC ACT CCT
380 P L T A I S S T G T P A V T P

1521 CCC TCG AGC ACC ATG TCC TAC ACT TCC GGT CAC TCG CCC AGT CCG
395 P S S T M S Y T S G H S P S P

1566 TCT TCC TCG GGC ATG TCT CCT CAA TCC AGA CAC AGC TCT ACC GCC
240 S S S G M S P Q S R H S S T A

1611 TCC TCG GTC ATG TAC CCC AAC TTG CCT GCC GTC AGT TCC GAT CTT
425 S S V M Y P N L P A V S S D L

1656 CCC CGG AGT CGA CAA CGT CGA CTT TCG GGA ACC CAG CTT GAC AGC
440 P R S R Q R R L S G T Q L D S

1701 AAC GAG CGT AGA CGC TAC TCT GGT GGC ATG TGC AGC GGG CCG CCC
455 N E R R R Y S G G M C S G P P

1741 CTG TCG CCC AGG TCG CCC ATC ATC TTT GAG GAC AGT CTC TGG CGT
470 L S P R S P I I F E D S L W R

1786 CAC TAC TCC CAA GGC GTC TGT GGC TTC GTC CAT CGG CTC TCC TTC
485 H Y S Q G V C G F V H R L S F

1831 CGC GTC TTT GAG TCT GAC TCG AGC GAG GGC GCA CGC GAA CGC GAG
500 R V F E S D S S E G A R E R E

1876 GAG AAG TAC GAC CAA TGG CTG GAG AAC ATG CGC ACC ATT GAG GCT
515 E K Y D Q W L E N M R T I E A

1921 CTC CGC GAG TAC ATC CGC GAC CGC ATT GAC CGT AGG GAC TTC TCC
530 L R E Y I R D R I D R R D F S

1966 GAG GAG GCC AAG TCA CCC GCG GCC AGC CGT CTC AAG TCC CCG GAG
545 E E A K S P A A S R L K S P E

2011 CCC ATG GAG GTC GAT GCC AAG CCG TCA CCA GCG GCA CCG CTG TAC
560 P M E V D A K P S P A A P L Y

2056 CCC ATC CTG CGT ATG CCC AAC TGA ggc acc ggc gct tga gta gga
575 P I L R M P N *
2101 ttg atg aga aga gcc cca gac aaa ctg ggc gcg tgt acc aac agc
2146 tgt ctg caa gcg tgt ttc gtc gaa aag ttt cac agc aaa aga aaa
2191 ggg caa agt gat ggc gtc aac ttt ggc tcg aat tct att cta cag
2236 cat tet ttc tta tcc cat tgc gcg gca ccg caa tac ggc ttc tgg
2281 caa ata tct ctt acg cct gtc gaa gcc tcc cga cct ctt tgt tta
2326 cgt tac cca tac cca agt cgg cgg atg atg aga ggg gaa gtg gat
2371 tga att acg cag tct ccc atg gac gca gat gga ttt cta ccg ggc
2416 gca tga agt ccc ccg gtg aac caa acc aaa taa aac aca aaa caa
2461 acg aaa aaa aaa aaa aaa aaa

Figura 1. Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzida do cDNA de *pacCl*. As regiões 5' e 3' não codificadoras e os introns estão representados em letras minúsculas. Os íntrons foram obtidos a partir da clonagem do fragmento amplificado do DNA total, obtido por PCR com o par de oligonucleotídeos Opac1/Opac3. Região de Kozak (CAMMATGNC), presente no início da tradução, está marcada pela caixa cinza e letras em negrito. Letras em negrito, presentes nos íntrons, representam possíveis resíduos envolvidos na retirada dos mesmos. Possíveis sítios de poliadenilação estão em negrito no terminal 3', assim como os sítios de término da tradução (cuja sequência consenso é CWTS), que estão evidenciados em caixas marrons. As setas representam o local de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e nos experimentos de PCR e RT-PCR.

1 MSAKQENESSGSNspKSStpAPSTATSNTSQSTGANS~~AE~~DNLICKWNSCNLKFVtpPEALY
 61 EHICERHVGRKSTNNLNLTCQWASCRTTTVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCEFCCGKSFKRP
 121 QDLKKHVKTHADDSVLVRspQDQGMNGYRAQPGKASSSYDHNHGMRTNSAAFAHQAGHA
 RA
 181 SYYPQPSTNYGLYFNQQPLNPPRSEYIGHGGYDNRAKRAFDMVDDFFAHAKRRQVDPT
 NLS1 ===== RB
 241 SYQQVGRSLLPLHGALGLHTGPMPGSDYMAAPPQQHPHQHVGHGPGPGPLTQQYYLPP
 301 MPNARTKNDLIQIDQILEQMQSTVYENANQATHGIHIHGQNTFDLRHspSPEGGHRGSIA
 361 GMSVNNDGYGAVSAAHMAspLTAISSTGtpAVtpPSSTMSYTSGHspSPSSSGMspQSRH
 SP
 421 SSTASSVMYPNLPAVSSDLPRSRQRRLSGTQLDSNERRRYSSGMCSGPPLspRspIIFED
 NLS2 ===== RC
 481 SLWRHYSQGVCGFVHRLSFRVVFESDSSEGAREREEKYDQWLENMRTIEALREYIRDRIDR
 541 RDFSEEAKspAASRLKspEPMEVDAKPspAAPLYPILRMPN

Figura 2. Sequência de aminoácidos deduzida do cDNA de *pacCl*. Regiões em negrito representam os três dedos de zinco; seus resíduos sublinhados são aminoácidos importantes para quelar o íon zinco; as letras minúsculas sublinhadas representam os motivos (S/T)PXX; os dois motivos sinal de localização nuclear NLS1 e NLS2 estão sublinhadas com linhas duplas; a caixa cinza, com letras em negrito, evidencia os dois motivos nos quais PaA liga-se a PacC de maneira dependente de pH e flanqueiam os sítios de sinalização da protease (caixa cinza SP); as caixas cinzas representam as regiões conservadas, obtidas pelo alinhamento e são identificadas como RA (Região A), RB (Região B), SP (sinal de sinalização da protease) e RC (Região C).

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190

C.lindemuthianus-FacC
G.acutata-FacC
F.oxysporum-FacC
F.verticillioideus-FacC
A.chrysogenum-FacC
M.grisea-FacC
S.sclerotiorum-FacC
B.fuckeliana-FacC
A.oryzae-FacC
A.parasiticus-FacC
A.niger-FacC
B.fischeri-FacC
A.fumigatus-FacC
A.giganteus-FacC
A.nidulans-FacC
F.chrysogenum-FacC
F.zuhrus-FacC
C.albicans-RIM101
C.dubliniensis-RIM101
D.hansenii-RIM101
Y.lipolytica-RIM101
C.neoformans-FacC
U.waydis-FacC
S.cerevisiae-RIM101
C.glabrata-RIM101
C.perniciosa-FacC
Clustal Consensus

DZ

200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380

C.lindemuthianus-FacC
G.acutata-FacC
F.oxysporum-FacC
F.verticillioideus-FacC
A.chrysogenum-FacC
M.grisea-FacC
S.sclerotiorum-FacC
B.fuckeliana-FacC
A.oryzae-FacC
A.parasiticus-FacC
A.niger-FacC
B.fischeri-FacC
A.fumigatus-FacC
A.giganteus-FacC
A.nidulans-FacC
F.chrysogenum-FacC
F.zuhrus-FacC
C.albicans-RIM101
C.dubliniensis-RIM101
D.hansenii-RIM101
Y.lipolytica-RIM101
C.neoformans-FacC
U.waydis-FacC
S.cerevisiae-RIM101
C.glabrata-RIM101
C.perniciosa-FacC
Clustal Consensus

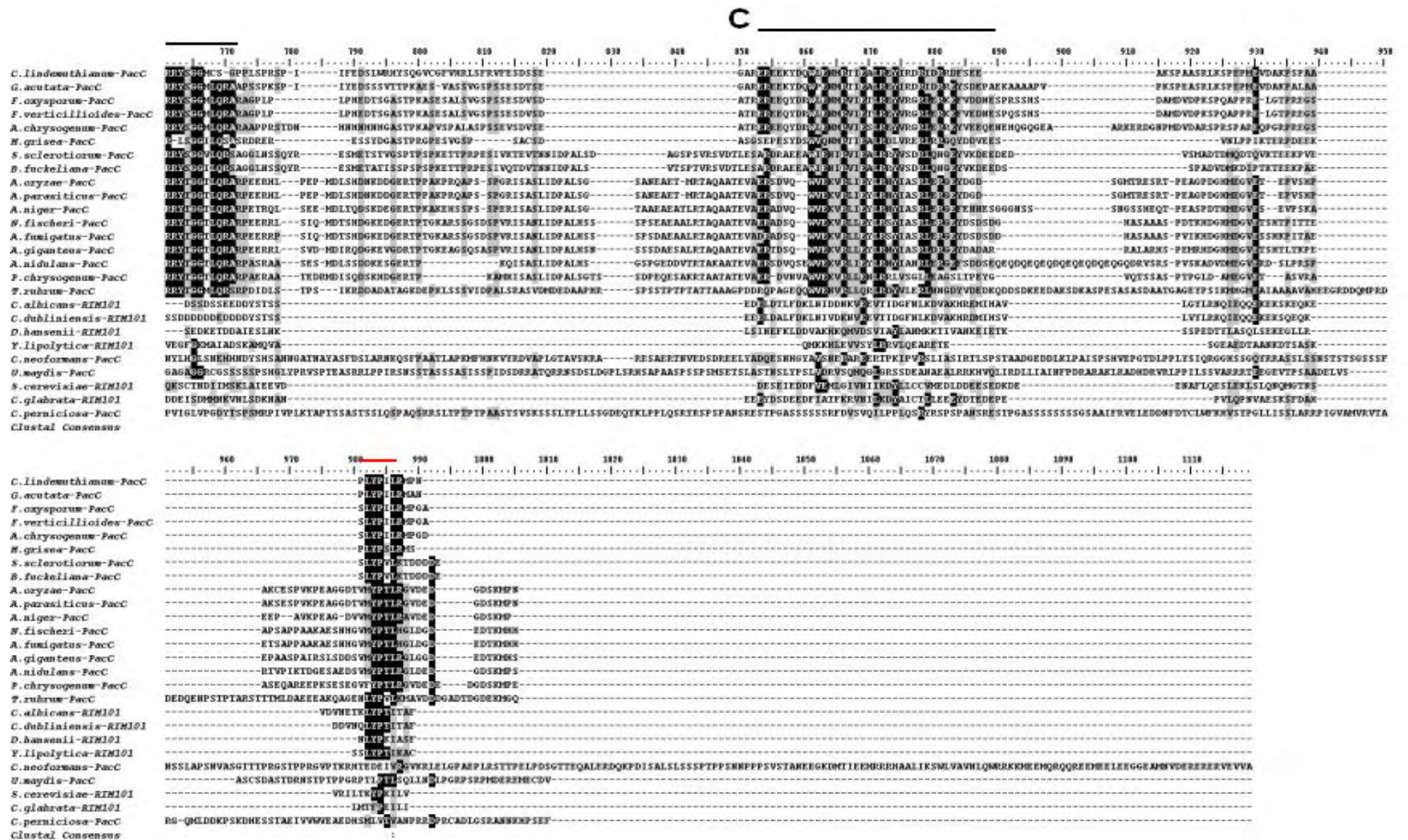


Figura 4. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína PacCl com diferentes proteínas da família PacC/Rim101 de diversos fungos filamentos e leveduras. Regiões conservadas dedo de zinco (DZ), A, B, C, Sinalização da Protease (SP) e X são destacadas pelas linhas sobre o alinhamento. Linhas vermelhas

demonstram o motivo de ligação da proteína PalA. Números de acesso GenBank: PacC de *Glomerella acutata* (Q8J254); PacC de *Fusarium verticillioides* (Q873X0); PacC de *Magnaporthe grisea* (Q52B93); PacC de *Aspergillus oryzae* (BAB20756); PacC de *Aspergillus parasiticus* (Q96UW0); PacC de *Neosartorya fischeri* (XP_001263266.1); Rim101 de *Candida albicans* (Q9UW14); Rim101 de *Candida dubliniensis* (Q873Y3); Rim101 de *Debaryomyces hansenii* (Q6BSZ4); Rim101 de *Yarrowia lipolytica* (CAA67927.1); Rim de *Candida glabrata* (Q6FV94); PacC de *Cryptococcus neoformans* (XP_572292); PacC de *Ustilago maydis* (CAG34353); Rim101 de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011836); PacC de *Acremonium chrysogenum* (Q96X49); PacC de *Neurospora crassa* (Q7RVQ8); PacC de *Fusarium oxysporum* (Q870A3); PacC de *Sclerotinia sclerotiorum* (Q9P413); PacC de *Aspergillus oryzae* (Q9HFB3); PacC *Trichophyton rubrum* (Q9C1A4); PacC de *Aspergillus niger* (Q00203); PacC de *Botryotinia fuckeliana* (AAV54519); PacC de *Aspergillus giganteus* (Q5XL24); PacC de *Penicillium chrysogenum* (Q01864); PacC de *Aspergillus fumigatus* Af293 (XP_754424); PacC de *C. perniciosus* (seqüência não depositada, gentilmente cedida por Gilvan Ferreira); e PacCl de *Colletotrichum lindemuthianum* (seqüência não depositada).

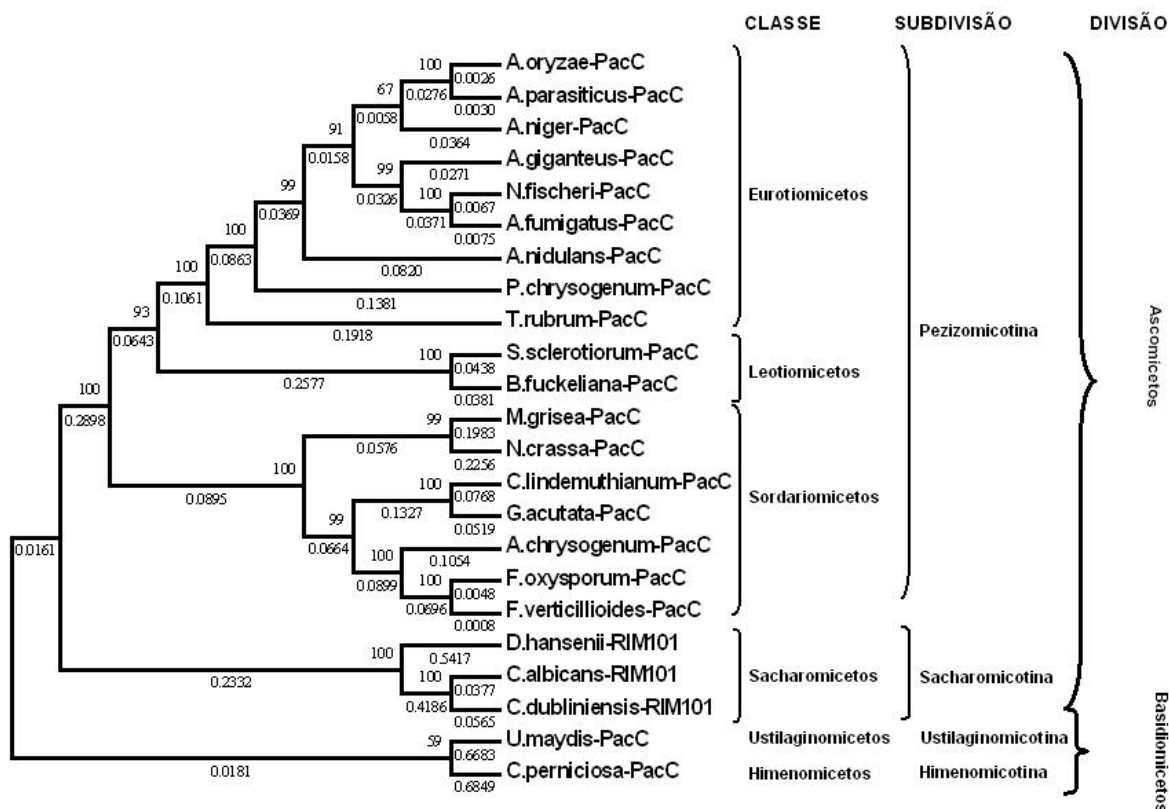


Figura 5. Análise filogenética das proteínas PacC/Rim101 de diversos fungos filamentos e leveduras. A árvore foi construída, usando o programa MEGA 3.1 pelo método do Vizinheiro mais Próximo, com bootstrap de 5000 réplicas. Números de acesso GenBank: PacC de *Glomerella acutata* (Q8J254); PacC de *Fusarium verticillioides* (Q873X0); PacC de *Magnaporthe grisea* (Q52B93); PacC de *Aspergillus oryzae* (BAB20756); PacC de *Aspergillus parasiticus* (Q96UW0); PacC de *Neosartorya fischeri* (XP_001263266.1); Rim101 de *Candida albicans* (Q9UW14); Rim101 de *Candida dubliniensis* (Q873Y3); Rim101 de *Debaryomyces hansenii* (Q6BSZ4); PacC de *Ustilago maydis* (CAG34353); PacC de *Acremonium chrysogenum* (Q96X49); PacC de *Neurospora crassa* (Q7RVQ8); PacC de *Fusarium oxysporum* (Q870A3); PacC de *Sclerotinia sclerotiorum* (Q9P413); PacC de *Aspergillus oryzae* (Q9HFB3); PacC *Trichophyton rubrum* (Q9C1A4); PacC de *Aspergillus niger* (Q00203); PacC de *Botryotinia fuckeliana* (AAV54519); PacC de *Aspergillus giganteus* (Q5XL24); PacC de *Penicillium chrysogenum* (Q01864); PacC de *Aspergillus fumigatus* Af293 (XP_754424); PacC de *C. perniciosa* (seqüência não depositada, gentilmente cedida por Gilvan Ferreira); e PacC de *Colletotrichum lindemuthianum* (seqüência não depositada).

4.2. Influência do pH ambiental na expressão do gene *pacCl*

A transcrição do gene *pacCl* foi analisada por meio da detecção do transcrito por Northern blot do RNA total do micélio, crescido durante cinco dias em meio líquido tamponado e o pH inicial variando de 3 a 9. No momento da coleta do micélio, o pH do sobrenadante foi avaliado.

Como controle deste ensaio, foi utilizado o gene *gpd* de transcrição constitutiva, também utilizado em outros trabalhos (Dufresne et al., 1998; Parisot et al., 2002). O resultado foi padronizado, obtendo-se a razão entre as intensidades das bandas do gene *pacCl* e a intensidade apresentada pelas bandas do *gpd*, sendo os resultados plotados no gráfico (Figura 6). As medidas densimétricas dos produtos amplificados foram obtidas por meio do programa de análises de imagens ImageJ 1.37V (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

A transcrição do gene *pacCl* foi detectada em todos os valores de pH testados, sendo transcrito tanto em condições ácidas quanto alcalinas. Na determinação quantitativa (Figura 6), observa-se claramente que o nível de transcrição é dependente de pH, aumentando em valores de pH mais alcalinos. O mesmo perfil de transcrição é observado para o gene *pacC* de *A. nidulans*, no qual PacC é capaz de ligar-se a cis elementos presentes no seu próprio promotor, ativando sua transcrição em pH mais alcalino (Tilburn et al., 1995). O aumento no nível de transcrição dos genes *pacC/RIM101*, com a elevação do pH extracelular, parece ser um padrão nos diferentes organismos, nos quais este gene foi isolado e estudado, tais como em *S. sclerotiorum* (Rollins, 2003), *F. oxysporum* (Caracuel et al., 2003), *F. verticillioidis* (Flaherty et al., 2003), *C. albicans* (Ramon et al., 1999), *Y. lipolytica* (Lambert et al., 1997) e *U. maydis* (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

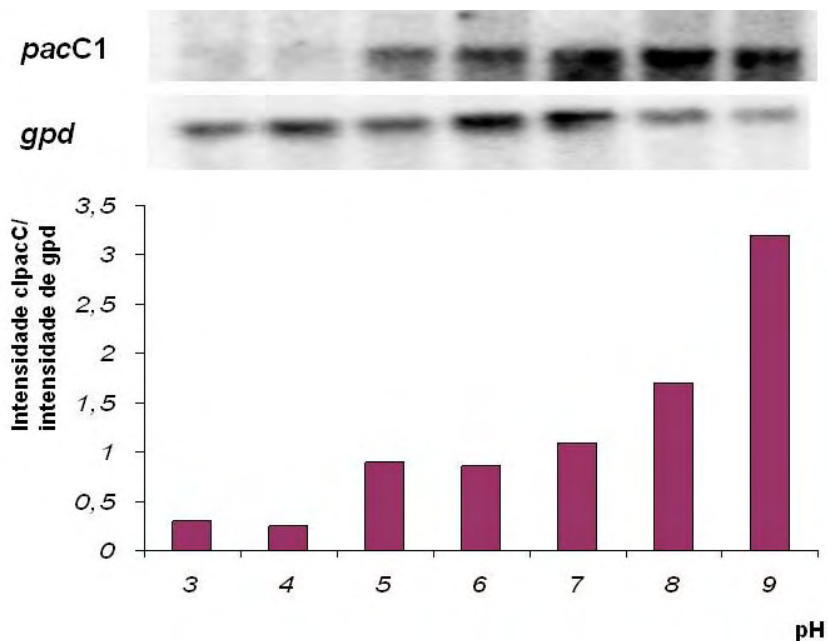


Figura 6. Efeito do pH ambiental no nível do transcrito *pacCl* no isolado selvagem UPS9: Culturas do isolado UPS9 foram obtidas em meio de cultura, com valores de pH tamponado variando de 3 a 9 durante cinco dias e, após esse período, extraiu-se o RNA total do micélio. RNA total (20 µg) foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo formaldeído e transferido para membrana de náilon sendo, posteriormente, hibridizado com sonda específica para *pacCl* e *gpd* marcadas com ³²P. A padronização da intensidade do sinal, estimada pelo programa ImageJ 1.37V (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), foi obtida pela razão do sinal para o gene *pacCl* pelo sinal do gene *gpd* e os resultados foram utilizados no gráfico.

4.3. Deleção funcional do locus *pacCl*

O gene *pacCl* foi interrompido em *C. lindemuthianum* por recombinação homóloga. O plasmídeo pBKSpac:hph2, contendo o cassete de resistência à higromicina interrompendo a seqüência do cDNA do gene *pacCl*, foi utilizado para transformar o isolado selvagem UPS9. A resistência à higromicina foi a marca utilizada para seleção de linhagens mutantes.

Mutantes para *pacCl* foram detectados por PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos Opac1/Opac2 (Tabela 1), pois, o transprimer está inserido na região entre estes dois oligonucleotídeos no vetor pBKSpac:hph2. Após o PCR utilizando o

DNA dos transformantes e esse par de oligonucleotídeos, o fragmento esperado de 1086 pb não foi amplificado em um dos transformantes, diferentemente das outras quatro linhagens transformantes testadas (Figura 7B). Considerou-se que, nesse transformante, denominado mutpac2, o gene *pacCl* foi interrompido. Experimento de PCR com os oligonucleotídeos Ohph3/Ohph4 (Tabela 1), que amplificam um fragmento de DNA de 712 pb do gene de resistência à higromicina-hph, foi realizado para verificar o evento de transformação. Em todas as linhagens transformantes, o gene de resistência à higromicina estava inserido no genoma das mesmas. A confirmação da interrupção do gene *pacCl* no mutpac2 poderá ser verificada, futuramente, por meio da análise de Southern blot. Os transformantes Tr1, Tr3 e Tr4, resistentes à higromicina, amplificaram tanto o fragmento esperado para o gene *pacCl* quanto para o gene *hph*. Nessas linhagens, possivelmente, *pacCl* não foi interrompido. A linhagem Tr2 possui um rearranjo no locus *pacCl*, pois o fragmento de DNA amplificado é menor que o esperado, quando se utilizaram os oligonucleotídeos Opac1/Opac2 (Figura 7B).

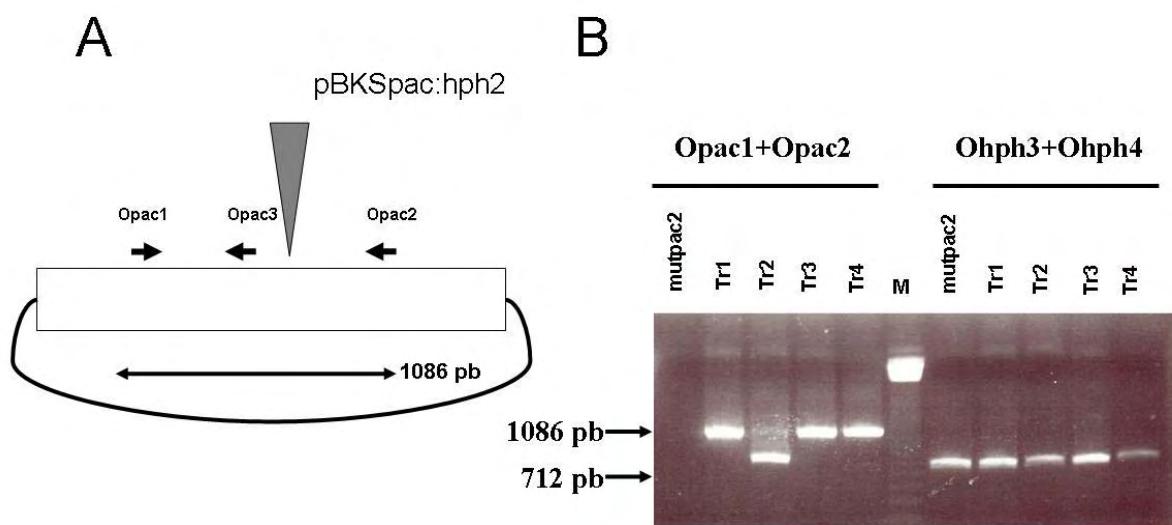


Figura 7. Análise da mutação do gene *pacCl*. **A:** plasmídeo pBKSpac:hph2 utilizado na transformação. Retângulo claro representa o fragmento do cDNA de *pacCl*. O transprimer (triângulo cinza) inseriu na região entre as seqüências de anelamento dos oligonucleotídeos Opac1 e Opac2 capazes de amplificar, por PCR, um fragmento de 1.086 pb. **B:** Resultado do PCR, utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos Opac1/Opac2 ou Ohph3/Ohph4 e DNA de diferentes linhagens. Mutpac2, Tr1, Tr2, Tr3 e Tr4 são linhagens transformantes de *C. lindemuthianum*; M – marcador 123 pb.

4.4. PacCl é necessário para o crescimento vegetativo de *C. lindemuthianum* em pH alcalino

Para verificar a influência do gene *pacCl* no crescimento de *C. lindemuthianum*, conídios das linhagens UPS9, mutpac2, e dos transformantes Tr1 e Tr3 foram inoculados em meio sólido tamponado em pH 3, 6 e 9.

Após seis dias de inoculação, todas as linhagens testadas cresceram de forma semelhante em meio de cultura com pH 6 (Figura 8). O crescimento radial em pH ácido, 3, foi bem menor em relação ao pH neutro, demonstrando que *C. lindemuthianum* cresce, preferencialmente, em pH próximo à neutralidade em relação à valores mais ácidos. As linhagens UPS9, Tr1 e Tr3 foram capazes de crescer em pH 9, sendo que o crescimento radial foi maior do que em pH 3. Claramente, valores de pH mais ácidos inibem o crescimento de *C. lindemuthianum*. Interessantemente, o crescimento do mutante mutpac2 foi, fortemente, inibido em pH 9 (Figura 8).

O crescimento das linhagens UPS9 e mutpac2 foi estimado medindo-se o crescimento radial a cada dois dias após inoculação das mesmas em meio tamponado, em diferentes valores de pH. A linhagem selvagem foi capaz de crescer em diferentes pHs, suportando variação de pH 3 até pH 9. Valores de pH 5, 6, e 7 propiciaram melhor crescimento de UPS9, seguindo-se pHs 8 e 9, nos quais a taxa de crescimento foi a mesma. Ambientes mais ácidos, pH 3 e 4, não favoreceram o crescimento, sendo este efeito mais notável em pH 3, conforme observado no experimento anterior. O isolado UPS9 é capaz de modificar o pH do meio de cultura, mesmo que este seja tamponado. A diferença entre pH final e o pH inicial do sobrenadante do meio de cultura líquido, utilizado na obtenção de micélio para o experimento de *Northern blot*, foi maior em valores de pH mais alcalinos. Estes resultados sugerem que *C. lindemuthianum* é mais eficiente em ajustar o pH alcalino extremo, 8 e 9, que em ambientes de extrema acidez, pH's 3 e 4 (dados não mostrados), o que confirma a capacidade desta espécie em crescer melhor sob pH básico, em relação a ambientes ácidos.

Diferentemente, o crescimento da linhagem mutpac2 sofreu maior inibição em valores de pH mais alcalinos. Esta linhagem não apresentou crescimento até o quinto dia, após sua inoculação em meio de cultura. O crescimento desta linhagem mutante foi

desfavorecido à medida que o pH ambiental tornou-se mais alcalino, tornando mais evidente a diferença de crescimento, em relação à linhagem selvagem (Figura 9)

O mutante *mutpac2* sofreu uma forte redução no crescimento em pH mais alcalino, em relação ao isolado UPS9, suportando valores de pH mais ácidos (Figura 9). O decréscimo do crescimento dos mutantes, com perda de função do gene *pacC/RIM101*, é freqüentemente observado quando os mesmos são inoculados em ambientes com pH elevado (Peñalva et al., 2002). Esses mutantes, crescendo em pH alcalino, apresentam o fenótipo que mimetiza o crescimento em pH ácido, ou seja, resulta na expressão de genes que no selvagem, são expressos preferencialmente em ambientes ácidos, bem como na redução da expressão de genes que, no selvagem, são expressos preferencialmente em ambientes alcalinos.

Provavelmente, genes necessários à adaptação de *C. lindemuthianum* em pH alcalino e cuja expressão é ativada pelo fator de transcrição PacC1 nesses valores de pH, não estão sendo expressos no *mutpac2*. Este resultado demonstra, claramente, que PacC1 é necessário para o crescimento normal de *C. lindemuthianum* em pH alcalino, assim como apóia a hipótese que no transformante *mutpac2* o gene *pacC1* está mutado, acarretando perda de sua função.

Mutantes nulos para o gene *pacC/RIM101* apresentam outros fenótipos, além da inibição do crescimento em pH's mais elevados. Em *S. sclerotiorum*, PacC é necessário para o desenvolvimento e maturação normal dos esclerócios (Rollins, 2003). A linhagem mutante tem crescimento normal em pH mais baixo, mas o crescimento foi completamente inibido em valores mais elevados. Além disso, o acúmulo de ácido oxálico foi, drasticamente, reduzido, além de haver desrepressão do gene *pg1* em valores de pH mais elevados, nos quais este gene é reprimido na linhagem selvagem.

Mudanças na morfologia, aumento da sensibilidade às enzimas líticas e na secreção de polissacarídeos são características, até o momento, relatadas apenas nos mutantes *pacC* no fitopatógeno *U. maydis* (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005). Este mutante também é mais sensível ao estresse osmótico, causado pelo aumento da concentração de íons Li^+ e Na^+ no meio de cultura, da mesma forma que mutantes *pacC^{+/-}* de *F. oxysporum* (Caracuel et al., 2003). Alteração na conidiogênese é relatada para os fungos *A. nidulans* (Tilburn et al., 1995) e *A. niger* (MacCabe et al., 1996).

A linhagem mutpac2 poderá ser testada quanto à sensibilidade a diferentes estresses ambientais para verificar o papel de PacCl na adaptação de *C. lindemuthianum* a estas condições.

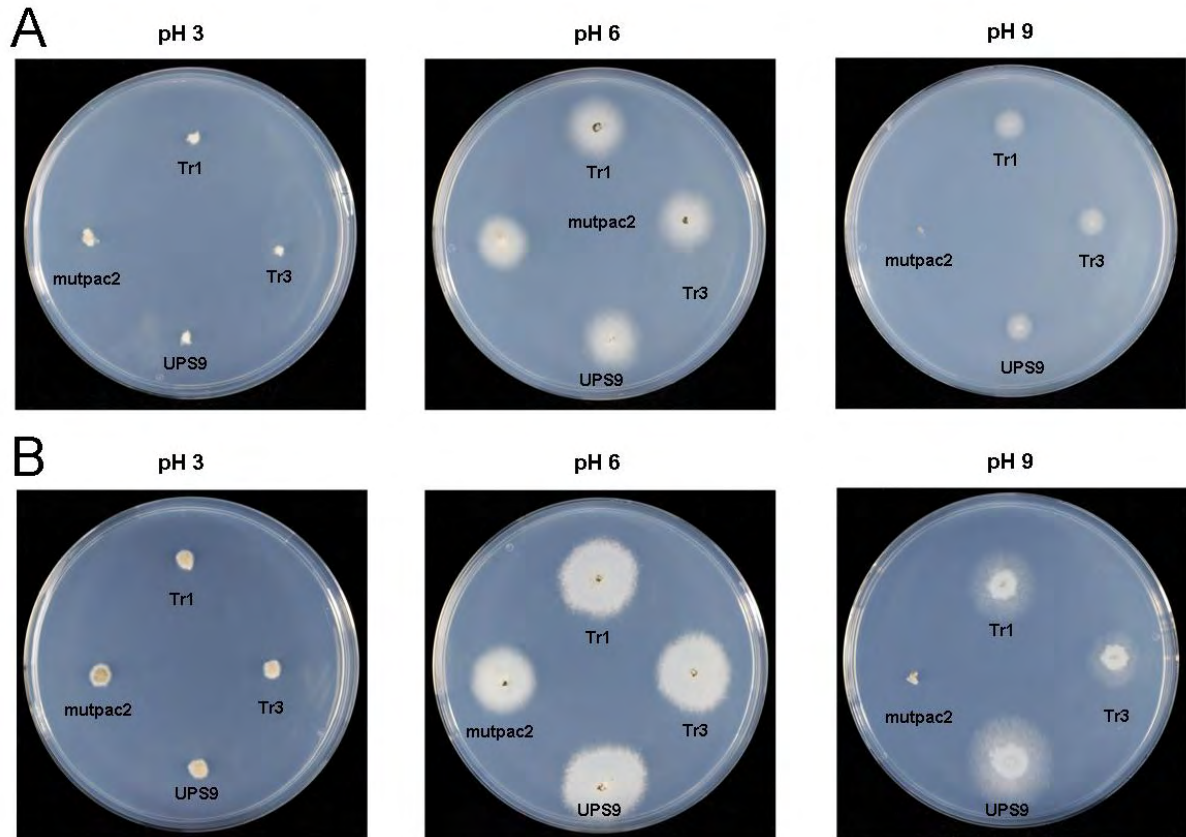


Figura 8. Efeito do pH ambiental no crescimento de transformantes obtidos com pBKSpac:hph2. Conídios do isolado selvagem (UPS9), dois transformantes Tr1 e Tr3 (provável integração ectópica) e mutpac2 (mutante com perda de função do *pacCl*) foram inoculados em meios com pH's 3, 6 e 9. **A:** após três dias de inoculação dos conídios; e **B:** após seis dias.

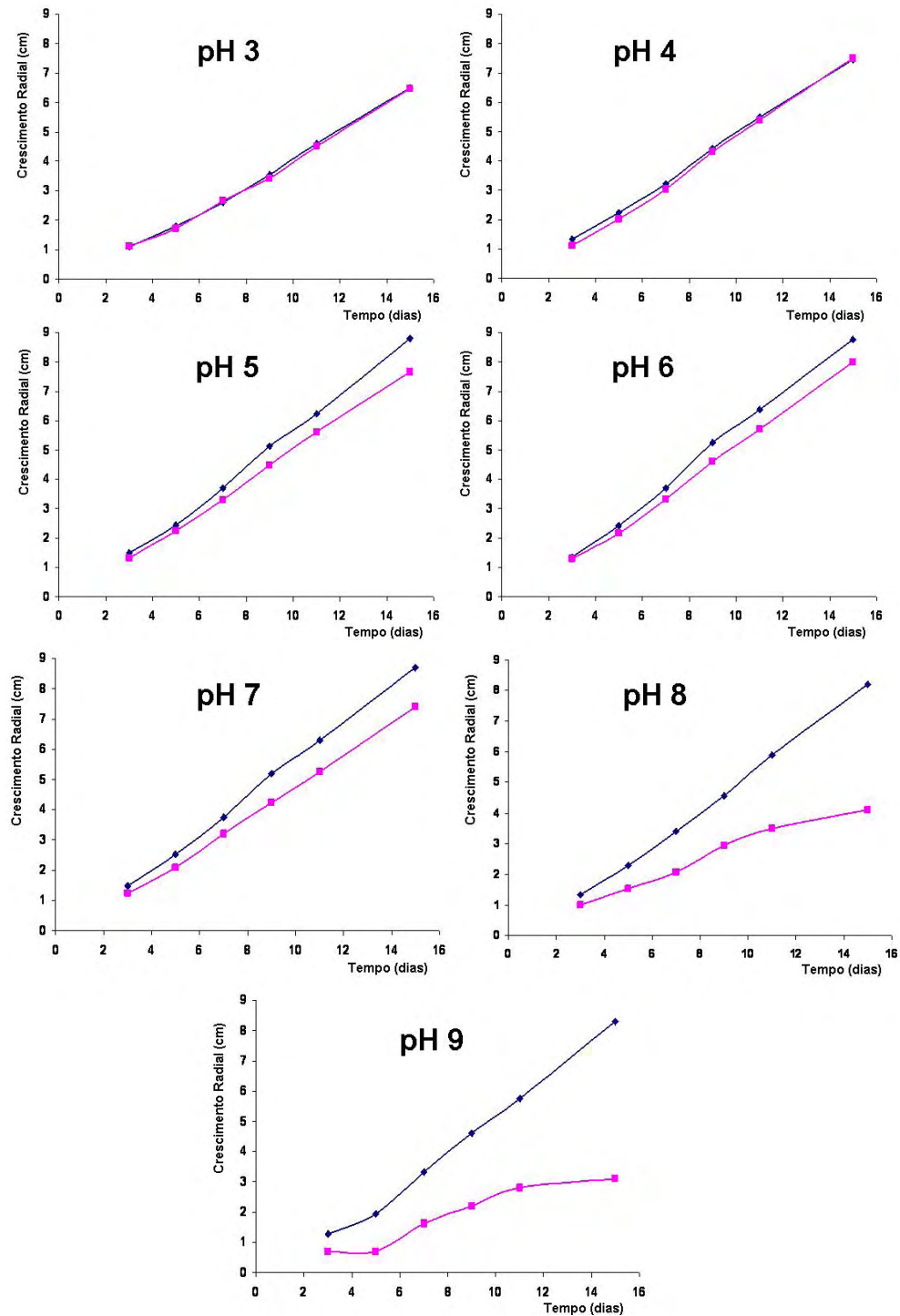


Figura 9. Curva de crescimento do isolado selvagem UPS9 e do mutante nulo *mutpac2* em diferentes valores de pH em meio de cultura tamponado. Discos de 7 mm de meio de cultura contendo micélio das linhagens foram inoculados no centro da placa de Petri contendo meio com pH tamponado em diferentes valores. O crescimento radial foi avaliado, em intervalos de dois dias. Os valores de pH do meio de cultura estão indicados em cada gráfico. Linha azul e rosa representam o crescimento das linhagens UPS9 e *mutpac2*, respectivamente.

4.5. PacCl é um fator de patogenicidade em *C. lindemuthianum*

Ensaio de infecção em folhas excisadas e plantas de feijoeiro foram realizados, a fim de determinar o efeito da perda da função do gene *pacCl* na patogenicidade de *C. lindemuthianum*.

Quando inoculada em folhas excisadas da cultivar suscetível La Victoire, o isolado selvagem UPS9 de *C. lindemuthianum* induz sintomas típicos da antracnose que, primeiramente, resulta em lesões escuras na nervura primária, cinco dias após a inoculação, estendendo-se posteriormente para as nervuras secundárias e resultando na maceração completa do tecido sete dias após inoculação (Figura 10A). Resultado semelhante foi obtido para os transformantes Tr1 e Tr3, cujo gene *pacCl* não foi deletado (Figura 10A). A linhagem mutpac2, na qual o gene *pacCl* foi interrompido, não tem capacidade para causar sintomas de antracnose similares à linhagem UPS9 (Figura 10A), até mesmo após maiores períodos de incubação. Raras e pequenas lesões marrom-claras podem ser observadas na nervura principal da folha, mas a área das mesmas não se estendeu, demonstrando um fenótipo não patogênico.

Plantas da cultivar La Victoire foram inoculadas para confirmar o fenótipo, apresentado pela linhagem mutante. Os sintomas apareceram 4-5 dias após a inoculação, iniciando-se com típicas lesões marrons nas folhas, pecíolos e nos hipocótilos. As lesões se expandiram com o tempo, resultando em maceração dos tecidos acompanhada da exsudação de um líquido marrom, levando a morte dessas plantas (Figura 10B). As linhagens Tr1 e Tr2 causaram antracnose de forma semelhante nas plantas (Figura 10B). Ao contrário do observado para estas linhagens, mutpac2 não foi capaz de ocasionar a morte da planta de feijoeiro, mesmo após nove dias de inoculação (Figura 10B). A inoculação de conídios dessa linhagem mutante resultou em lesões claras nas nervuras principais, seis dias após inoculação. Diferentemente do observado em folhas excisadas, algumas dessas lesões estendem-se até às nervuras secundárias, mas não foi observada a exsudação de líquido nessas regiões. Pequenas e raras lesões também foram visualizadas nas nervuras secundárias, pecíolos e hipocótilo. Como essas lesões não são capazes de causar a maceração dos tecidos vegetais, a planta permaneceu viva mesmo nove dias após inoculação dos conídios (Figura 10B).

A linhagem mutpac2 pode ser considerada não patogênica, devido a sua incapacidade de macerar o tecido vegetal, comum na antracnose. Apesar de serem observadas lesões marrom-claras, o processo de infecção que leva ao seu desenvolvimento não progride e esta linhagem não consegue fechar seu ciclo de reprodução assexuada na planta caracterizado pela ausência de lesões com exsudados. Conídios de *C. lindemuthianum* podem ser encontrados em regiões de lesão no tecido do feijoeiro, nas quais ocorrem a exsudação durante o processo de maceração (Pellier et al., 2003).

Para determinar o fenótipo de mutpac2 durante o processo de infecção, a cinética de infecção desta linhagem foi acompanhada por microscopia. Após dois dias de inoculação dos conídios, o mutante mutpac2 diferenciou apressórios melanizados, assim como a linhagem selvagem (Figura 11A). Hifas primárias e secundárias foram observadas no isolado selvagem UPS9, sete dias após inoculação, coincidindo com a visualização macroscópica do tecido vegetal macerado (Figura 11B). A diferenciação de hifas secundárias, a partir das hifas primárias, marca a passagem da fase biotrófica para a necrotrófica (O'Connell, 1985). Os conídios diferenciados na linhagem mutpac2 foram funcionais e capazes de propiciar a penetração do tecido epitelial, pois, hifas primárias foram visualizadas sete dias após inoculação dos conídios (Figura 11B). A cinética de infecção das linhagens Tr1 e Tr3 foi semelhante à linhagem selvagem (dados não mostrados). Ao contrário da linhagem selvagem, o mutante não diferenciou hifas secundárias. Em nenhum campo de observação foi possível verificar a presença dessas hifas características da segunda fase de nutrição deste fungo, levando à conclusão que *pacCl*, em *C. lindemuthianum*, é um regulador de genes necessário para a transição da fase biotrófica para a necrotrófica. O tecido vegetal infectado com a linhagem mutpac2 apresentou células vegetais mais claras, com fluorescência diferenciada em relação às demais células do hospedeiro, próximo aos sítios de infecção (Figura 12 A-B) ou em contato com hifas primárias (Figura 12 C). O acúmulo de compostos fenólicos oxidados, visualizado quando se utilizou anilina azul para coloração de calose (González et al., 2006), possivelmente está ocorrendo nessas células levando-as à morte. Células vegetais infectadas precocemente por hifas primárias, não se mantêm vivas por longo período e morrem (O'Connell et al., 1985). Essa morte parece ser o sinal para a diferenciação das

hifas secundárias do fitopatógeno. Este efeito pode ser o resultado das lesões observadas, macroscopicamente, nas folhas excisadas e plantas de feijoeiro infectadas pela linhagem mutpac2.

Considerando que a patogenicidade de um organismo é caracterizada pela sua capacidade de colonizar, eficientemente, o hospedeiro e fechar seu ciclo de vida a partir da nutrição do mesmo, propõe-se que *pacCl* esteja envolvido com a patogenicidade em *C. lindemuthianum*.

Durante a colonização do tecido do hospedeiro, é necessário que o fitopatógeno tenha um controle preciso da expressão de seus genes no tempo correto, adaptando-se, dessa forma, eficientemente às condições ambientais no tecido, a fim de completar seu ciclo de vida. A escassa disponibilidade de nutrientes no tecido vegetal é um dos importantes sinais que controlam a expressão de genes envolvidos na patogenicidade de vários microrganismos patogênicos (Divon & Fluhr, 2006). Genes codificando reguladores gerais da absorção e utilização de fontes de nitrogênio e, ou carbono são importantes para a patogenicidade de fitopatógenos, pois eles permitem o ajuste da expressão gênica frente às limitações de nitrogênio e carbono no tecido do hospedeiro. O gene *clnr1* de *C. lindemuthianum* codifica um fator de transcrição, que capacita esse fitopatógeno a utilizar diferentes fontes de nitrogênio, sendo sua transcrição requerida para sua patogenicidade. Isto foi demonstrado pela incapacidade do mutante *clnr1* de desenvolver a fase necrotrófica durante a infecção de cultivares susceptíveis de feijoeiro (Pellier et al., 2003), assim como a linhagem mutpac2 obtida no presente trabalho. Um segundo gene denominado CLTA1, codificando outro ativador transcriptional em *C. lindemuthianum*, é necessário para a transição da fase biotrófica para a necrotrófica (Dufresne et al., 2000), sendo a proteína codificada por ele homóloga à família de proteínas GAL4. Genes necessários à utilização de fontes de carbono complexas são regulados, positivamente, pelo gene SNF1 em *Cochliobolus carbonum*, sendo que sua inativação resulta em mutantes menos virulentos (Tonukari et al., 2000).

O pH ambiental é capaz de modular a patogenicidade, em diferentes patógenos de plantas e insetos (Prusky & Yakoby, 2003; Akimitsu et al., 2004) e até mesmo em patógenos de humanos como *C. albicans* (De Bernardis et al., 1998), modulando a expressão de fatores de virulência como enzimas hidrolíticas de parede celular, proteases

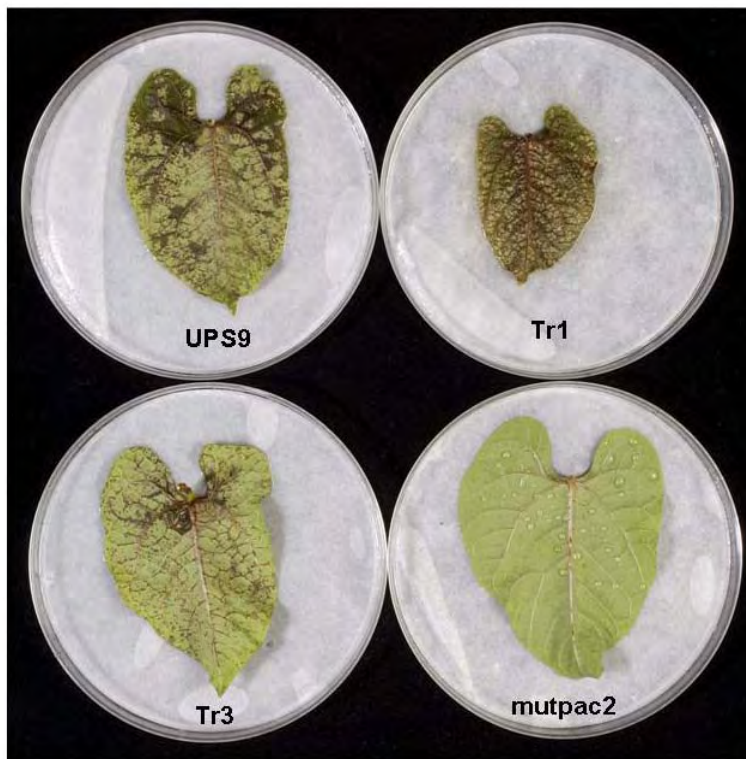
e até mesmo a filamentação em leveduras. Os fitopatógenos podem encontrar variações de pH tanto temporalmente quanto espacialmente, durante o processo de colonização do hospedeiro. Neste caso, o fator de transcrição PacC/Rim101 pode ter um papel fundamental na regulação de genes necessários à infecção eficiente, determinando a virulência e, ou patogenicidade nesses organismos. Em *S. sclerotiorum*, PacC funciona como um fator de virulência (Rollins, 2003), assim como seus ortólogos em *A. nidulans* (Bignell et al., 2005) e *C. albicans* (Davis et al., 2000). Claramente, o papel de PacC na virulência/patogenicidade varia de acordo com a espécie estudada. No fitopatógeno *F. oxysporum*, mutantes *pacC* são mais virulentos do que a linhagem selvagem, sugerindo que PacC se comporta como um regulador negativo da virulência (Caracuel et al., 2003). Interessantemente, as linhagens mutantes *pacC* em *U. maydis* foram tão virulentas quanto o selvagem, quando inoculadas em plantas de milho (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

A medida do pH apoplástico das folhas da cultivar susceptível La Victoire de feijoeiro foi cerca de 6,35. Neste pH, possivelmente, a proteína PacCl é processada de maneira dependente de pH, passando para sua forma ativa e sendo capaz de ativar a transcrição do seu próprio gene (Figura 6). Portanto, PacCl está funcional nas células de *C. lindemuthianum* UPS9, quando sua hifa cresce no interior do tecido hospedeiro La Victoire. Essa hipótese de que ela também está ativando genes de virulência é factível. Interessantemente, o pH apoplástico da cultivar resistente Jalo foi, aproximadamente, 5,6. Felle et al. (2004) conclui que mudanças no pH apoplástico são importantes indicadores da interação planta-patógeno, correlacionando os diferentes estádios de infecção de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* com os diferentes tipos de resposta de defesa da planta hospedeira.

A partir destes dados, sugere-se que PacC em *C. lindemuthiaum* é fundamental para a patogênese, ativando genes necessários, que o capacitam a passar da fase biotrófica para a necrotrófica. A complementação da linhagem mutpac2 com o gene *pacCl* ou com seus ortólogos, assim como o subsequente teste de patogenicidade da mesma poderá corroborar com esta proposição.

A patogenicidade e virulência do transformante Tr2 com rearranjo em seu gene *pacCl* (Figura 7) poderá ser, futuramente, testada a fim de verificar o efeito do rearranjo na interação *C. lindemuthianum* e seu hospedeiro.

A



B

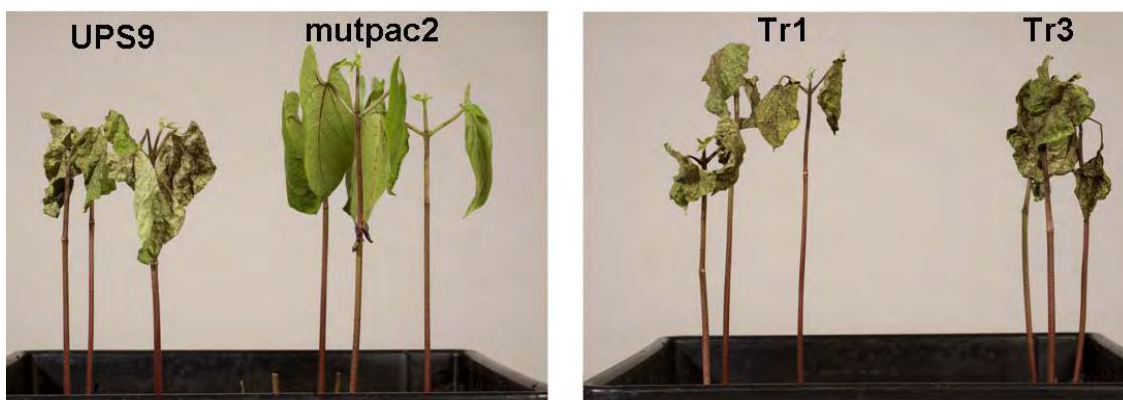


Figura 10. Efeito do gene *pacCl* na patogenicidade de *C. lindemuthianum* na cultivar susceptível La Victoire. **A: Folhas cotiledonares excisadas foram inoculadas com conídios do isolado selvagem UPS9, os transformantes Tr1 e Tr3 e a linhagem mutante mutpac2. **B:** Plantas da cultivar La Victoire susceptível à antracnose foram pulverizadas com uma suspensão de conídios, obtida das mesmas linhagens do experimento anterior. Fotografias foram obtidas após nove dias de inoculação.**

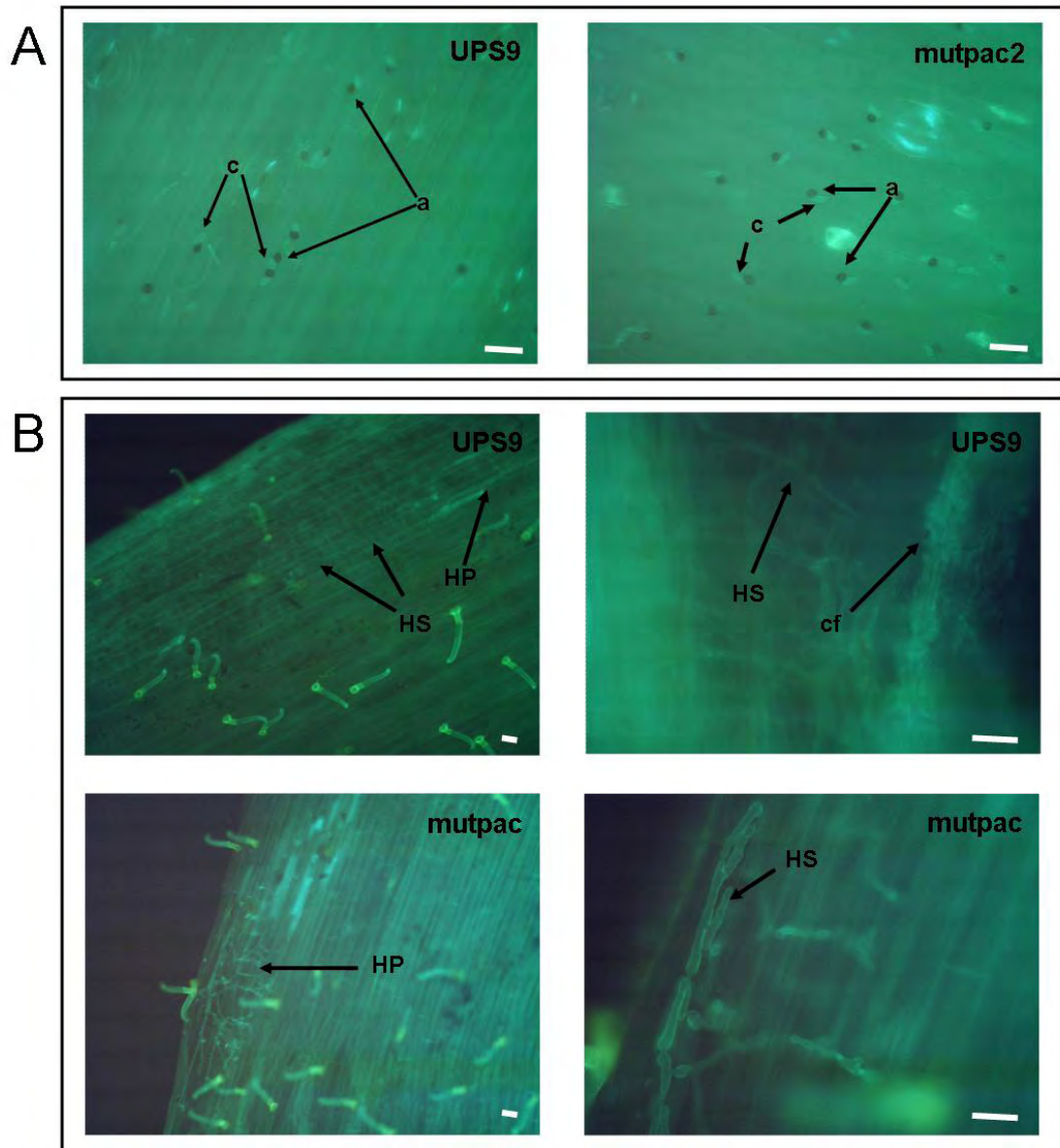


Figura 11. Efeito do gene *pacCl* na patogenicidade de *C. lindemuthianum* na cultivar susceptível La Victoire. Hipocótilos excisados foram inoculados com conídios do isolado selvagem UPS9 e da linhagem mutante *mutpac2*. **A:** Dois dias após a inoculação, os conídios de ambas linhagens desenvolveram apressórios melanizados **B:** A linhagem selvagem foi capaz de infectar o tecido vegetal desenvolvendo hifas primárias e secundárias fechando dessa forma seu ciclo de infecção. O mutante *mutpac2* ficou restrito à fase biotrófica, caracterizada por hifas primárias, não sendo capaz de passar para a fase necrotrófica. a-apressório; c-conídio; HP-hifas primárias; HS-hifas secundárias; cf-conidióforo. Barra de escala representa 25µm.

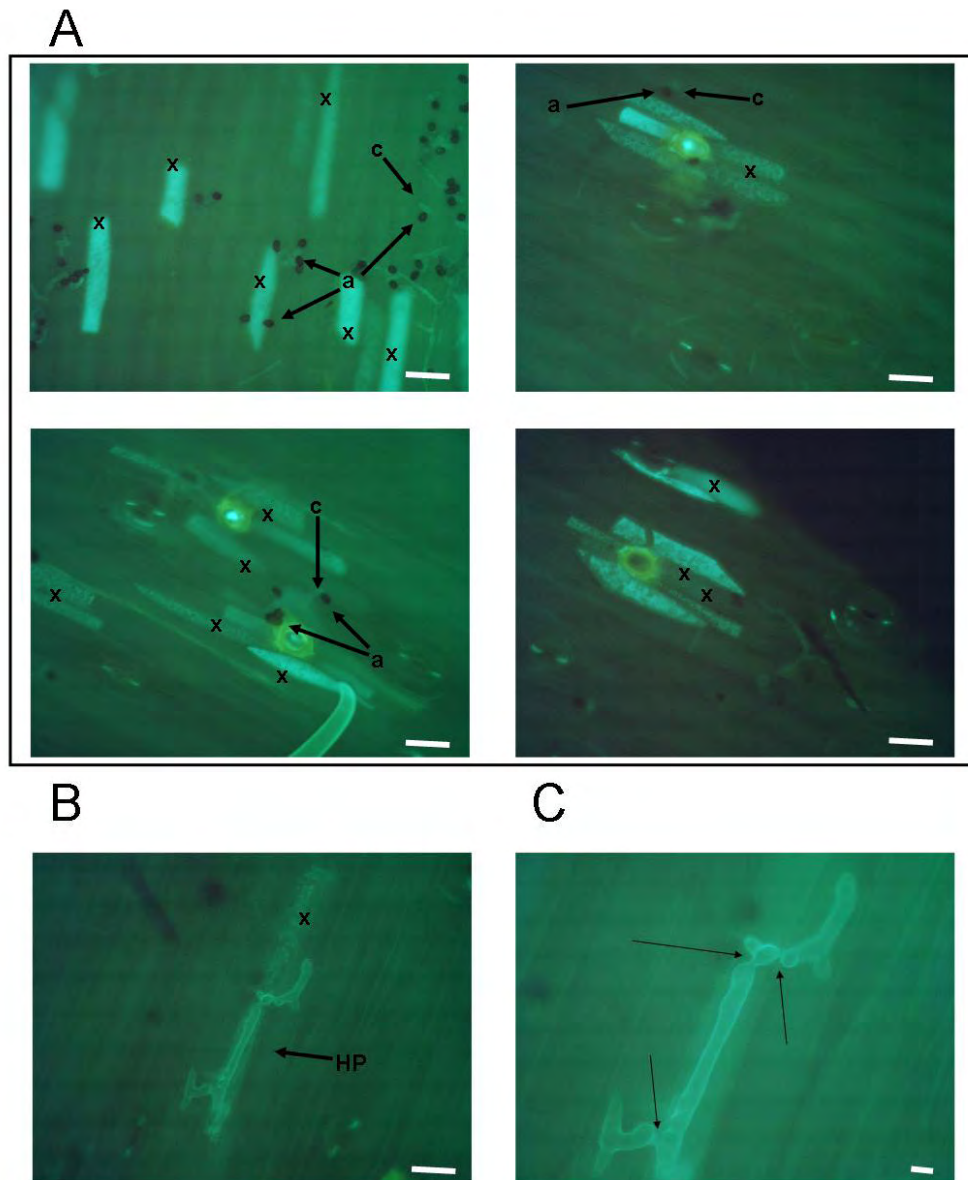


Figura 12. Viabilidade das células vegetais da cultivar La Victoire inoculadas com conídios da linhagem mutpac2. Células vegetais apresentam fluorescência diferenciada (x) nos locais de penetração do hospedeiro (A) e em contato com as hifas primárias (B). A Figura C representa o aumento de 2x a figura B. Fotografias foram obtidas, após nove dias de inoculação. a-apressório; c-conídio; HP-hifas primárias. Barra de escala representa 25µm.

4.6. Transcrição do gene *pacCl* durante a cinética de infecção

A técnica de RT-PCR foi usada para avaliar a transcrição do gene *pacCl* em *C. lindemuthianum*, durante o curso de sua infecção, em plantas de feijoeiro. Para o controle da biomassa fúngica no tecido vegetal, foram utilizados os oligonucleotídeos Ogpd11/Ogpd2 (Tabela 1), capazes de amplificar o gene *gpd* de expressão constitutiva (Parisot et al., 2002).

O gene *pacCl* foi transcrito nas células de *C. lindemuthianum*, durante a cinética de infecção (Figura 13). Após 18h de inoculação, foi possível detectar o transcrito do gene *pacCl* pela amplificação do fragmento de 353 pb, obtido por RT-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos Opac1/Opac3 (Tabela 1). Utilizando-se RNA total do micélio, crescido em meio de cultura, como matriz para o RT-PCR, foi obtido um fragmento de mesmo tamanho (Figura 13). A partir do DNA total, foi amplificado um fragmento maior de 485 pb, devido à presença de dois íntrons. O período em que se inicia a detecção do transcrito *pacCl* (18 horas após a inoculação das plantas) é marcado pela germinação do conídio. A quantidade de transcrito aumenta progressivamente, durante as fases biotrófica e necrotrófica, sendo observado também um aumento correlacionado da biomassa fúngica no tecido vegetal (Figura 13).

O gene controle *gpd*, constitutivamente transcrito, foi inicialmente detectado após 30 h, em relação ao tratamento no qual foi detectado o transcrito de *pacCl*. Neste período, hifas primárias já estão diferenciadas e a colonização progressiva de *C. lindemuthianum* no tecido hospedeiro leva à diferenciação de hifas secundárias, de modo que a biomassa fúngica no tecido vegetal aumenta progressivamente com o tempo, o que está relacionado ao aumento na intensidade do transcrito de *gpd* (Figura 13).

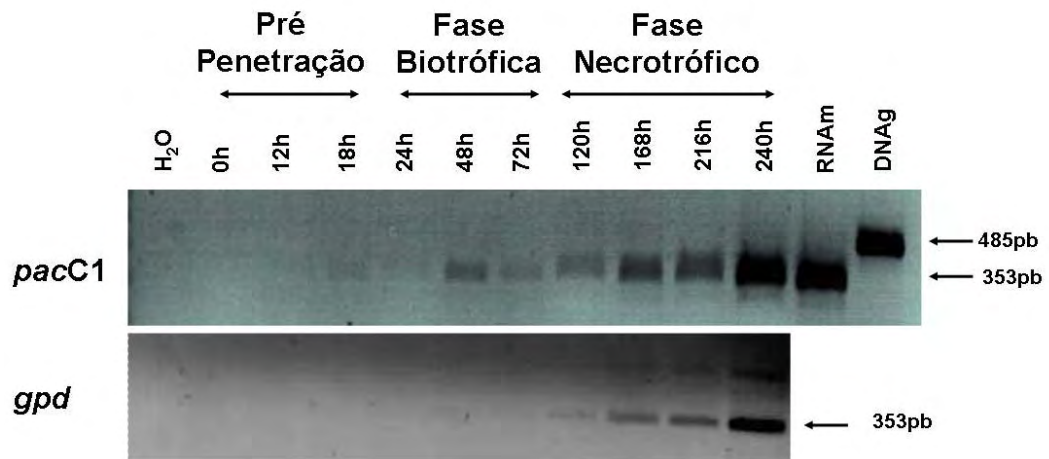


Figura 13. Transcrição do gene *pacCl* durante a cinética de infecção do isolado selvagem UPS9 inoculado na cultivar susceptível La Victoire. RT-PCR semiquantitativo foi realizado usando-se oligonucleotídeos específicos (*gpd1* e *gpd2*) para o gene *gpd*, expresso constitutivamente (Dufresne et al., 1998) e um par de oligonucleotídeos (*Opac1* e *Opac2*) para o gene *pacCl*, que amplifica uma região contendo os dois introns presentes no DNA genômico (485 pb). Os cDNAs dos genes *pacCl* e *gpd* apresentam 353 pb e 345 pb, respectivamente. RNA total das folhas de feijoeiro não inoculadas (H₂O) ou inoculadas com conídios foram coletadas em diferentes tempos após a inoculação. O tempo em horas é indicado, acima da figura. RNA total (RNAm) e DNA genômico (DNAg) do micélio crescido *in vitro* foram utilizados, como controle da amplificação do transcrito de gene *pacCl*.

4.7 Influência da mutação no gene *pacCl* na atividade enzimática de lipase

A atividade da lipase foi detectada em meio de cultura, tanto para o isolado selvagem UPS9 quanto para o mutante *mutpac2*. O índice de atividade enzimática de lipase foi menor na linhagem selvagem, indicando que o gene *pacCl*, possivelmente, influencia a capacidade de produção desta enzima (Figura 14 A). Para confirmar esse resultado, as duas linhagens foram cultivadas em meio de cultura líquido, sendo determinadas as unidades de lipase presentes no sobrenadante. Atividade de lipase foi detectada a partir da cultura selvagem, mas não foi detectada a atividade dessa enzima no sobrenadante da cultura de *mutpac2* (Figura 14 B).

A detecção da atividade de lipase, por meio do método do halo de degradação, em diferentes espécies de *Colletotrichum* demonstrou que esta é dependente do pH. Em geral, a lipase foi ausente em pH ácido e secretada em pH alcalino (Maccheroni et al.,

2004). Em *Fusarium graminearum*, assim como em outros fungos fitopatogênicos, a síntese de lipase extracelular é um fator de virulência necessário na infecção de cereais (Voiht et al., 2005). Os resultados em *C. lindemuthianum* indicam que o *mutpac2* é deficiente na produção ou secreção de lipases extracelulares. É provável que PacCl esteja envolvida na regulação da síntese de lipase em *C. lindemuthianum*.

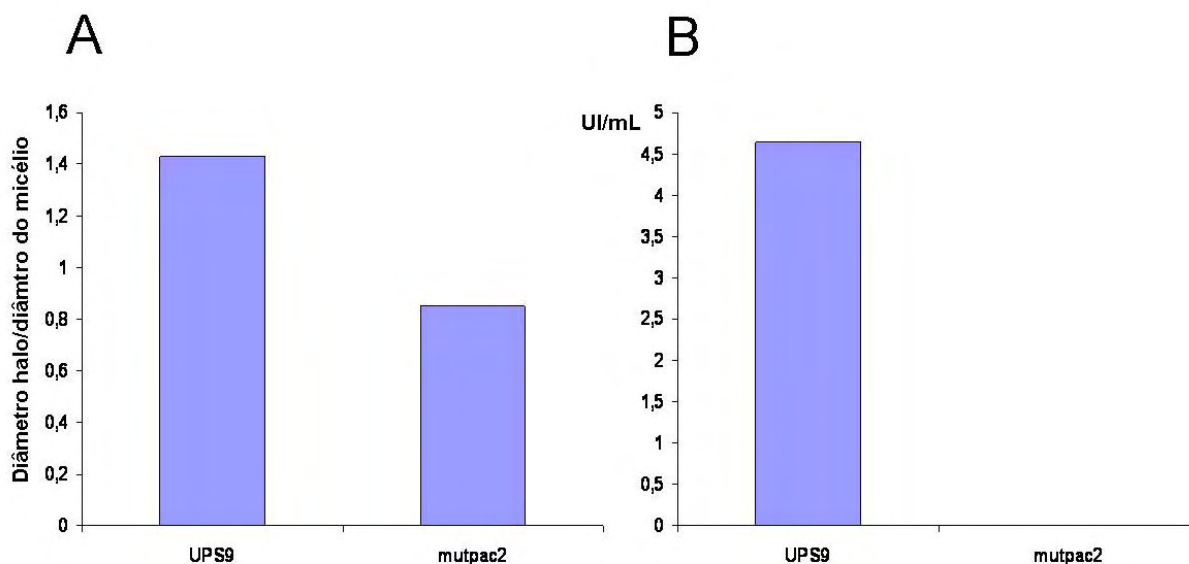


Figura 14. Atividade de lipase em meios de cultura sólido e líquido dos isolados UPS9 e mutpac2. A: Índice de atividade da lipase em meio sólido e **B:** Unidades de lipase (UI) no sobrenadante de culturas líquidas. Uma Unidade Internacional de lipase é definida como a atividade enzimática capaz de liberar 1 μmol de $-\text{SH}$ do substrato tributirato ditiopropanol (BALB). $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.8. Genes *pala* e *palF* envolvidos na transdução de sinal ativada por pH ambiental

A análise do banco de EST de *C. lindemuthianum* revelou dois clones UPA1P47_H11_BKR e UPA1P28_F07_BKR, contendo seqüências cujos produtos da tradução possuem as proteínas PalA e PalF, respectivamente.

O clone UPA1P47_H11_BKR foi seqüenciado completamente usando-se os oligonucleotídeos Opala3 e Opala4 (Tabela 1), sendo obtida uma seqüência de 2.018 pb.

Três seqüências consenso CWTS, envolvidas com o término da tradução foram identificadas nas posições +107, +113 e +144, após o códon de terminação (Figura 15).

A seqüência de aminoácidos, obtida da tradução do cDNA, contém 608 resíduos (Figura 15) com homologia com a família de proteínas PalA/Rim20p de fungos filamentosos e leveduras, possuindo 59% de identidade e 75% de similaridade com PalA de *N. crassa* (Q7S532), sugerindo que *C. lindemuthianum* possui o gene *palACI*. A seqüência do cDNA, armazenada no banco de EST, possui apenas a seqüência parcial do RNAm do provável gene *palACI* de *C. lindemuthianum* conforme o resultado do alinhamento de aminoácidos, obtido pelo ClustalX (Figura 16). Diferentemente da família PacC/Rim101, a família PalA/RIM20 tem homologia em toda sua extensão, de acordo com a pesquisa Blast. PalACI também possui homologia com um grupo de proteínas envolvidas com transdução de sinal em eucariotos superiores, como a proteína Alix de *Caenorhabditis elegans* (NP_499213).

O peptídeo parcial de PalACI possui quatro motivos de ligação ao motivo SH3 nas posições 66, 304,552 e 591 (Figura 15). Da mesma forma, três motivos, consenso PXXP, estão presentes na proteína PalA de *A. nidulans* (Negrete-Urtasun et al., 1997).

A pesquisa no Pfam revelou, na região entre os resíduos 3 e 136 de PalACI, a presença de um domínio semelhante a BRO1 (Figura 15). Este domínio presente em Rim20, ortólogo de PalA, capacita sua interação com a proteína Vps32 de *S. cerevisiae* (Boysen & Mitchell, 2006), que é uma proteína componente do ESCRT III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Estes resultados sugerem que a família de proteínas PalA/RIM20 pode servir como adaptador que ligam PacC/Rim101 a um complexo multiprotéico, presente no lado citosólico da membrana do endossomo, de forma dependente do pH que culmina com a ativação do fator PacC/Rim101 (Arst e Peñalva, 2003; Boysen & Mitchell, 2006).

A detecção do transcrito *palACI* em diferentes valores de pH ambiental foi verificada por RT-PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos Ortpala1 e Ortpala2 (Tabela 1). A transcrição de *palACI* ocorreu em faixas de pH ácido, neutro e alcalino (Figura 17).

O segundo clone obtido no banco de EST, identificado como UPA1P28_F07_BKR, foi parcialmente seqüenciado, utilizando os oligonucleotídeos R e

Opalf2 (Tabela 1) e obtendo uma seqüência de 1.217 pb (Figura 18). A tradução desta seqüência originou um polipeptídio de 407 aminoácidos com homologia à família de proteínas PalF/RIM8 de fungos e leveduras, que fazem parte da cascata de sinalização mediada por pH ambiental. Este polipeptídeo possui maior identidade (40%) e similaridade (57%) com PalF de *Aspergillus clavatus* (XP_001271847). O alinhamento da seqüência de aminoácidos traduzida, denominada PalFCl, com as proteínas PalF de *A. nidulans* e *A. clavatus* demonstrou que o clone de cDNA não possui a região C-terminal (Figura 19).

PalF de *A. nidulans* pertence ao grupo da família de proteínas Arrestina. O seu domínio N-arrestina é capaz de interagir com a cauda citoplasmática C-terminal da PalH, levando à fosforilação e ubiquitinação de PalF de maneira dependente do pH (Herranz et al., 2005). PalFCl possui um domínio N-arrestina conservado entre os resíduos 5 e 123. A família de proteínas PalF e arrestina de mamíferos possuem um motivo altamente conservado, cujo consenso é (L/I/V)X(L/I/V)(S/T)(L/F) e em PalFCl é sua seqüência é LTVSL (Figura 18). Um segundo domínio C-arrestina, entre os resíduos 237 e 405 de PalFCl, demonstrou ser menos conservado quando foi realizada a análise de motivos no Pfam (Figura 19).

A análise filogenética das proteínas PalAcl e PalFCl foi realizada empregando-se o programa MEGA 3.1 pelo método do Vizinheiro mais Próximo com geração de duas árvores filogenéticas (Figura 20). PalAcl e PalFCl são homólogas às demais proteínas de fungos Sordariomicetos. As árvores filogenéticas, geradas da análise das proteínas PalA/Rim20 (Figura 20A) e PalF/Rim8 (Figura 20B), separaram claramente os organismos analisados em grupos distintos, mas, filogeneticamente relacionados ao nível de classe, chegando em certos cladogramas ao nível de Ordem (Figura 20).

1	CGG CAC GAG GAG AAG AGG AAG TAC GGC GAG GAG GTT GCG CGT TTG	45
1	R H E E K R K Y G E E V A R L	15
46	CAG GAT GCC GTG GCG TGT GTG AAC GAG GGA TTG AAG GAG AGC CGC	90
16	Q D A V A C V N E G L K E S R	30
91	GGT GGT TAT CTG AAC AAG GCA GTT CTC GAA GAT CTG ACG GGT CTC	135
31	G G Y L N K A V L E D L T G L	45
136	AAG AGG AAG GTT GAG GAG GAT CTG AAG CGG GCG GAA AAG GAC AAT	180
46	K R K V E E D L K R A E K D N	60
181	GAC GTT ATC TAT CTT CAA CCC GTG CCG CCA AAA TCG GAG CTC AAG	225
61	D V I Y L Q P V P P K S E L K	75
	Ortpalal →	
226	ATT CTC GAG AGA GCC AAC ATG GCA GTT TCC AAG GTG CCT CCT CAG	270
76	I L E R A N M A V S K V P P Q	90
271	GTC GGC AAT CCC TTT GAT TAC CTC GGA GAC CAG GCC GAG TTT GGC	315
91	V G N P F D Y L G D Q A E F G	105
316	CCT GCC CTC TTC ACC AAA CTG GTG CCA TTT TCA GTG CAT GCC GCC	360
106	P A L F T K L V P F S V H A A	120
361	ATC ACC ATC TAC GAG CAA CTT CGC GAC CGA ATC GTC AAC GAA AAC	405
121	I T I Y E Q L R D R I V N E N	135
406	ATC ATT GGC CAG ATG GAA ACG CAG ACA GAG AAG CTG CAC AGC ATG	450
136	I I G Q M E T Q T E K L H S M	150
	← Opala2	
451	CTG AGT TCG ATC AAC CTG CCC GGC TCA CTG CAA GCT CTC GAG AAG	495
151	L S S I N L P G S L Q A L E K	165
	Opala3 →	
496	CCC CTC GGG CTG CCC CAC AGC TTG GTG CAT CAT GCC GAA GAG ATG	540
166	P L G L P H S L V H H A E E M	180
541	CGA CAG GCA GAC GCT CTT GGC CGT ATC CAG AGG GCC TTT TCC GAT	585
181	R Q A D A L G R I Q R A F S D	195
586	ATT GAC AAG CTT CGC AAC TCA GAC TTG GCG GTA TTC AAC GAG GGC	630
196	I D K L R N S D L A V F N E G	210
631	AAG GCG ATA CTC GAG GCG GAA GAG GAG GAA GAC CAG AGA CAC AGG	675
211	K A I L E A E E E E D Q R H R	225
676	AGA AAA TAT GGC ACC GAC AGG TGG TCG AGA CCA GAA AGC CGC GGC	720
226	R K Y G T D R W S R P E S R G	240
721	GAT GCC CAG GGC GCG CAA TTT TGG GCT CAA GTG GCG GAG ATT GAG	765
241	D A Q G A Q F W A Q V A E I E	255
766	GGT TAT TTC GCC AGC AGC ACC AGC AGC GAC GCG TTG GTG AGG GAA	810
256	G Y F A S S T S S D A L V R E	270
811	AAA TTC AAG GAA GTG CAG GAC CTT CTT GAG AAG CTT TCT GGA CCA	855
271	K F K E V Q D L L E K L S G P	285


```

601   A   S   S   G   I   R   F   G   *

1846  ccc ccc aaa aga aag aag cag gaa gtg gtt tga cga agc aca ttt   1890
1891  atg gtt gta gtt gtt gtt gaa gtg agc ctg gcg ttg gga ggc tgg   1935
1936  atc gtc atg ata gat gta tca tat ctc cag ctc tgt cat cgg cgg   1980
1981  ttg acc gtc tat tct ttt gaa aaa aaa aaa aaa aaa   2016

```

Figura 15. Seqüência parcial do RNAm do putativo gene *palACI* e seu produto derivado da tradução. A região 3' não codificadora está representada em letras minúsculas. Seqüências de aminoácidos, marcadas pela caixa cinza, representam o domínio conservado BRO1, presente na família PalA/RIM20 de fungos e leveduras. Aminoácidos sublinhados demonstram os quatro motivos de ligação de proteínas com domínio SH cujo consenso é PXXP. As quatro caixas cinzas, destacando a seqüência de nucleotídeos, que são possíveis sinais do termino da tradução com seqüência consenso CWTS. As setas representam o local de anelamento dos oligonucleotídeos, utilizados no seqüenciamento e nos experimentos de RT-PCR.

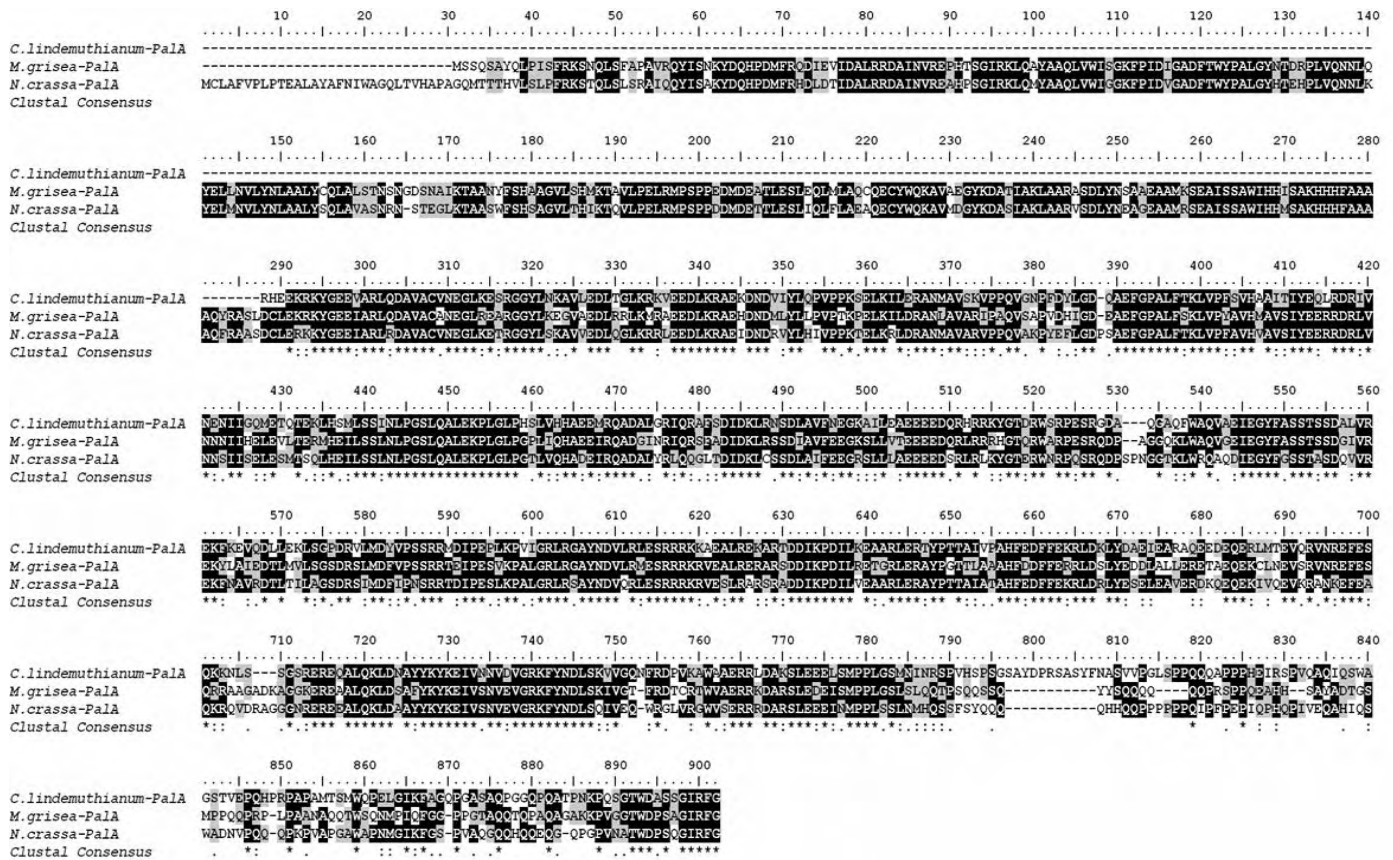


Figura 16. Alinhamento da seqüência parcial da proteína PalA com seus homólogos em *M. grisea* e *N. crassa*. O alinhamento das seqüências foi obtido usando o ClustalX. As seqüências utilizadas no alinhamento são:: PalA de *M. grisea* (Q51N3); PalA de *N. crassa* (Q7S532) e PalA de *C. lindemuthianum* (seqüência não depositada)

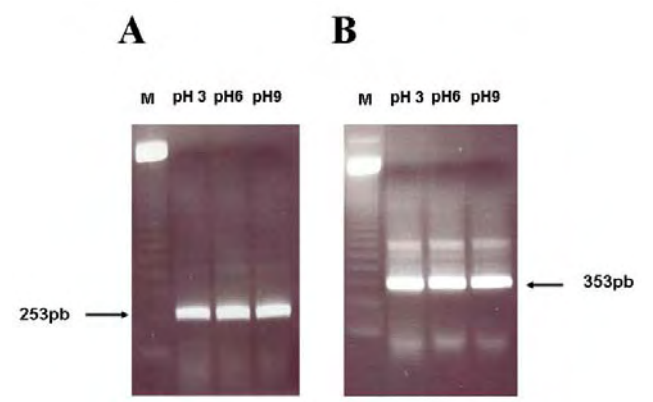


Figura 17. Análise dos transcritos *palA*Cl do micélio do isolado selvagem UPS9 crescendo em diferentes valores de pH por meio de RT-PCR. Os pares de oligonucleotídeos Ortpal1/Ortpal2 (A) e Ogpd1/Ogpd2 (B) foram utilizados para amplificar um fragmento específico de 252 pb de *palA*Cl e 345 pb do gene *gpd*. O isolado selvagem foi crescido em meio de cultura com pH tamponado nos valores de 3, 6 e 9. M representa o marcador de tamanho 123 pb (Invitrogen).

1	GGC ATC ACC CAC CTC ACA GTG TCC CTG CAC GGC TAT GTT CGC GTC	45
1	G I T H L T V S L H G Y V R V	15
46	CAC AAA GGC CCC GCA ATC AGC GAG CCC GCC GTC ACG AAT CCC GCC	90
16	H K G P A I S E P A V T N P A	30
91	TTG TCC GGC GGA CGC TCC TCG GCG CAA TAC CAC GGT AAT GGC TAC	135
31	L S G G R S S A Q Y H G N G Y	45
136	GCG TCG CTG TTT CAG GAC GAG CAG GTG CTC AGC GGC GAG GGG AGG	180
46	A S L F Q D E Q V L S G E G R	60
181	CTG GAG GCT TCC AAG TAC GAA TTC AAG TTT GAT CTA CTG TTT CCC	225
61	L E A S K Y E F K F D L L F P	75
226	GGA AAA GGC TTG CCC AGC AGC ATC GAT TTT GAG CGA GGT ACG ATA	270
76	G K G L P S S I D F E R G T I	90
271	TCC TAC ATG ATC ACC GCA ACC CTG ACG CGG CCG ACT GCC ATA TCA	315
91	S Y M I T A T L T R P T A I S	105
316	CCG ACC ACG TCG TGC GAC CGC AAA ATC CAG TTG GTA GAG AAG GTG	360
106	P T T S C D R K I Q L V E K V	120
361	GAC ATT GGA CCT CTC GCA CCG CCC AGG CCA CGG ACC ATC TAC CTC	405
121	D I G P L A P P R P R T I Y L	135
406	GAA CCG ATA TCA AAA AAA GCG AAG CGA AGG AGG ACG GGC GCC GAC	450
136	E P I S K K A K R R R T G A D	150
451	AAG GCC GCC CTC GCC GAT GCT CTG GAC CAA AGT TCC GAC ATG GAA	495
151	K A A L A D A L D Q S S D M E	165
496	CAG AGA GAA GCC GCG CCC ACA CCA GAA CCG CCG TCG ACG AGC GAG	540
166	Q R E A A P T P E P P S T S E	180
541	GAT CAA TCC CTC GAC CCG CTC GAT CAG CCG CGG AGT CCC ACG CAC	585
181	D Q S L D P L D Q P R S P T H	195
586	ACC GAC ATC CAG AGC GAA GTC AGC GGC GAC AGC ACC ATC AGC TCC	630
196	T D I Q S E V S G D S T I S S	210
631	AGT ACA GGC ATC AGT TTA CGA AGA GCC GAG CCC AAC GTG GGC AGC	675
211	S T G I S L R R A E P N V G S	225
676	AGC TCC TTG ACA AAC TCT AAG ATG CAA GCA GTG GAA GAT AAG ATA	720
226	S S L T N S K M Q A V E D K I	240
721	TTC CCC GCC AAG ATT GTA GTG CTA AGA GGA GGG GCT CTG CCA GGG	765
241	F P A K I V V L R G G A L P G	255
766	GAT ACA GTG TCT GTC AAG GTG TCT GTG CAG CAC ATC AAG AAG ATC	810
256	D T V S V K V S V Q H I K K I	270
811	AGA AGC ATG CAT GGT GTC ATT GTC ACC ATG TAC CGC CAA GGC AGG	855
271	R S M H G V I V T M Y R Q G R	285
856	ATC GAC ACA GCA CCG CCA GCC TCC ATG TTT GCC GAC ATC ATG ACC	900
286	I D T A P P A S M F A D I M T	300
901	AAA GAG GAG ACT CGC AAA CTC GCA AAA GAA GAC TAC TAC CCA CGG	945
301	K E E T R K L A K E D Y Y P R	315

946	TCA CGC ACA GGA CTG GGC GGT CTG ACC CTG ACG TCG ACA TCG TCG	990
316	S R T G L G G L T L T S T S S	330
991	TTG AGC GTC TTT CGC AAG GAC TTG TCG CAG TCG GTT GCT CCT CTC	1035
331	L S V F R K D L S Q S V A P L	345
1036	ATC ATC GAC CCT GTC ACA CTC GAG ACG ACC GTT AAC AGC CTC GGT	1080
346	I I D P V T L E T T V N S L G	360
1081	CAA GGT GCC CGG AGG ATG TTT TTC CAA CAA GAA AGG ACG CCA GGT	1125
361	Q G A R R M F F Q Q E R T P G	375
1126	GAG ATG GTC AGC TTC AAG TAT CAA GTG GAA GTC CTG GTC GAT GGA	1170
376	E M V S F K Y Q V E V L V D G	390
1171	AAG ACT GGC AAT CAA TTT CAG AGG CGG CCA GTC AAA TTC ACG CCA	1215
391	K T G N Q F Q R R P V K F T P	

Figura 18. Seqüência parcial do RNAm do putativo gene *palFCl* e seqüência de aminoácidos deduzida. A primeira e a segunda seqüência de aminoácidos, marcadas em cinza, representam os domínios N-Arrestina e C-Arrestina, respectivamente. Aminoácidos sublinhados representam o motivo conservado LTVSL no domínio N-Arrestina de PalF de fungos filamentosos e de mamíferos.

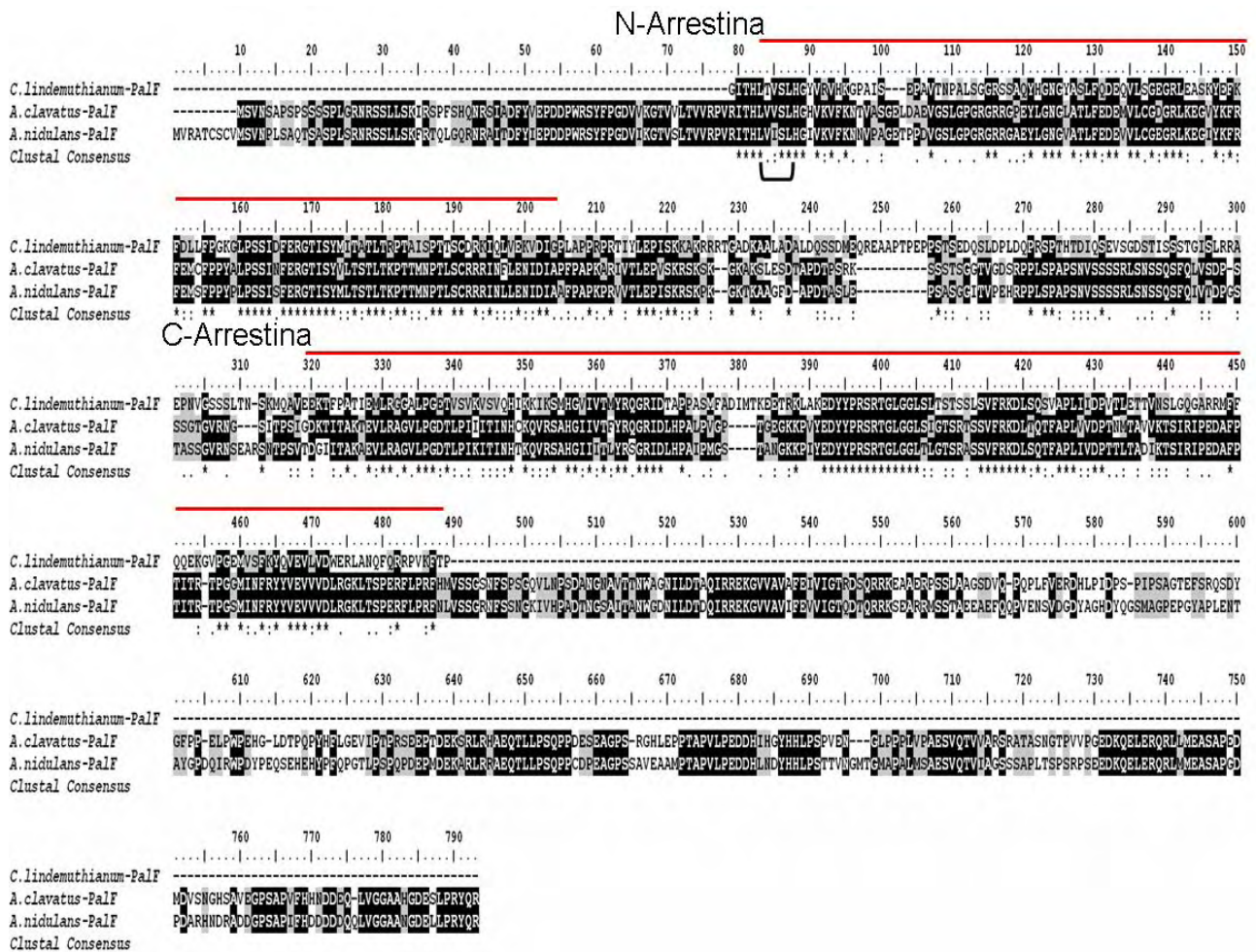


Figura 19. Alinhamento da seqüência parcial da proteína PalFCI com seus homólogos em *A. nidulans* e *A. clavatus*. O alinhamento das seqüências foi utilizando-se o programa ClustalX. As regiões marcadas pela linha escura representam os domínios N-Arrestina e C-Arrestina. O motivo N-arrestina, conservado na família PalF de fungos e arrestina de mamíferos, é evidenciado pelo colchete escuro. As seqüências utilizadas no alinhamento foram: PalF de *A. nidulans* (XP_659448.1); PalF de *A. clavatus* (XP_001271847.1) e PalF de *C. lindemuthianum* (seqüência não depositada).

5. CONCLUSÕES

O fungo *C. lindemuthianum* controla a transcrição de genes regulados por pH, por meio do fator de transcrição PacCl relacionado, filogeneticamente, à família de fatores de transcrição Dedo de Zinco, do tipo Cys₂Hys₂, PacC/Rim101 conservado em fungos filamentosos e leveduras.

Assim como em outros organismos, a transcrição do gene *pacCl* é dependente de pH. Sua transcrição é ativada à medida que o pH aumenta, sendo necessária para capacitar *C. lindemuthianum* a crescer em pH alcalino. A ativação da PacCl, durante o processo de colonização do hospedeiro, possivelmente ativa a transcrição de fatores de virulência em *C. lindemuthianum* necessários ao crescimento necrotrófico. A perda de sua função resulta numa linhagem incapaz de iniciar a fase necrotrófica, caracterizada pelo desenvolvimento abundante de hifas secundárias na linhagem selvagem. Conseqüentemente, essa linhagem não causa maceração do tecido vegetal, mantendo a planta viva. Aparentemente, *pacCl* é um gene que confere patogenicidade a *C. lindemuthianum*.

O modo pelo qual PacCl é ativado pela cascata sinalizadora dependente de pH, possivelmente assemelha-se ao mecanismo descrito para *A. nidulans* envolvendo os genes PalA, PalB, PalC, PalF, PalH e PalI, pois, no banco de EST de *C. lindemuthianum*, foram encontradas seqüências parciais que podem ser traduzidas nas proteínas PalACl e PalFCl homólogas às famílias PalA/Rim20 e PalF/Rim8 de diversos fungos filamentosos e leveduras.

A obtenção de outras linhagens mutantes com perda de função de PacCl ou a complementação da mutação *pacCl*, utilizando-se genes ortólogos, poderá corroborar os resultados obtidos neste trabalho.

A busca de genes ativados por PacCl poderá elucidar várias funções necessárias na transição da fase biotrófica para a necrotrófica de *C. lindemuthianum*. Além disso, auxiliará no entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a esse processo. Estes resultados poderão ser utilizados na busca por formas eficientes de controle da antracnose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, K. I.; Palácios, 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) 635–42.
- Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., Prusky, D.: Sugars and pH : A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. Physiol Mol Plant Pathol 65 (2004) 271-275.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25 (1997) 3389-02.
- Aréchiga-Carvajal, E.T.; Ruiz-Herrera, J.: The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. Eukaryot Cell 4 (2005) 999-1008.
- Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: Recognizing gene regulation by ambient pH. Fungal Genet Biol 40 (2003) 1-3.
- Balance, D. J.: Sequences important for gene expression in filamentous fungi. Yeast 2 (1986) 229-36.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N., Jr.; Rogers, T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. Mol Microbiol 55 (2005) 1072-84.
- Boysen, J.H.; Mitchell, A.P.: Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. Mol Biol Cell 17 (2006) 1344-53.
- Brown R. L., Clevel, T. E., Mellon, J. E.: Spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls, decay of intercarpellary membranes, and production of fungal pectinases. Phytopathology 82 (1992) 462-67.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., Gonzalez-Verdejo, C.I., Garcia-Maceira, F.I.; Di Pietro, A.: The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Mol Microbiol 48 (2003) 765-79.
- Cooper, R. M.: The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In Biochemical Plant Pathology, Ed. by J. A. Callow (1983), 101-36. John Wiley Sons, London;

- Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P.; Ibrahim, A.S.: *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68 (2000) 5953-9.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A.; Fonzi, W.A.: The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66 (1998) 3317-25.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *Embo J* 21 (2002) 1350-9.
- Divon, H. H.; Fluhr, R.: Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol Lett* 266 (2007) 65–74
- Drori, N.; Kramer-Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okon, Y.; Pines, O.; Prusky, D.: External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), 3258-62.
- Dufresne, M. Caractérisation de deux gènes, identifiés par mutagénèse insertionnelle, impliqués dans le déroulement du processus infectieux de *Colletotrichum lindemuthianum* sur le haricot commun, *Phaseolus vulgaris* L. Orsay:France, 1997. These de docteur en Sciences de L'Université Paris XI Orsay.
- 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.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A.L.; Bailey, J. A.; Langin, T. A GAL4-like Protein Is Involved in the Switch between Biotrophic and Necrotrophic Phases of the Infection Process of *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. *The plant Cell* 12 (2000) 1579-89.
- Espeso, E.A.; Arst, H.N., Jr.: On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 3355-63.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C.V., Valencia, A., Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 274 (1997) 466-80.
- Felle, H. H.; Herrmann, A.; Hanstein, S.; Hüchelhoven, R.; Kogel, K-H.: Apoplastic pH Signaling in Barley Leaves Attacked by the Powdery Mildew Fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *MPMI* 17(2004) 118–23.

- Fernández-Martínez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A.; Espeso, E.A.: Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334 (2003) 667-84.
- Flaherty, J. E.; Pirttilä, A. M.; Bluhm, B. H.; Woloshuk, C. P.: *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2003) 5222-27.
- Gao, S., Shain, L.: Activity of polygalacturonase produced by *Cryphonectria parasitica* in chestnut bark and its inhibition by extracts from American and Chinese chestnut. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46(1995) 199–213.
- Gómez-Gómez, E.; Ruíz-Roldán, M.C.; Di Pietro, A.; Roncero, M.I.G.; Hera C.: Role in Pathogenesis of Two Endo- β -1,4-xylanase Genes from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* *Fungal Genetics and Biology* 35 (2002) 213-222.
- González, J.; Reyes, F.; Salas, C.; Santiago, M.; Codriansky, Y.; Coliheuque, N., Silva, H. *Arabidopsis thaliana*: a model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. *Biol Res* 39 (2006) 221-28.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E.; Kinghorn, J.R. The structure and organisation of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*. Kinghorn, J.R. (ed.). (1987) Oxford: IRL Press, pp. 93–139.
- Hall, T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 (1999) 95-8.
- Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A. and Vincent, O.: Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12141-6.
- Jacobs, G. H.: Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *EMBO J.* 11(1992) 4507–17.
- Kramer-Haimovich, H., Servi, E., Katan, T., Rollins, J., Okon, Y.; Prusky, D.: Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 72 (2006) 1034-9.
- Kozak, M.: Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* (1984) 12 857-72.
- Kumar, S., Tamura, K.; Nei, M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5 (2004) 150-63.

- Lambert, M.; Blanchin-Roland, S.; Le Louedec, F.; Lepingle, A.; Gaillardin, C.: Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 3966-76.
- Latunde-Dada, A. O.: *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2 (2001) 187-98;
- Maccheroni Jr., W; Araújo, W. L.; Azevedo, J. L.: Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum* *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 61 (2004) 298-302.
- MacCabe, A. P.; van denHomergh, J. P. T. W.; Visser, J.; Tilburn J.; Arst Jr., H. N.: Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Molecular and General Genetics* 250 (1996) 367-74.
- Malvessi, E.; Silveira, M.M.: Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47(2004) 693-702.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., Legendre, L.: Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* Vol.43 (2003) 359-366.
- Negrete-Urtasun, S.; Denison, SH; Arst Jr,H.N.: Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1832-35.
- Nigg, E. A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386 (1997) 779-87.
- O'Connell R. J. ; Bailey J. A. ; Richmond D. V. : Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological plant pathology* 27(1985): 75-98
- Penalva, M.A.; Arst, H.N., Jr.: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66 (2002) 426-46.
- Penalva, M.A.; Arst, H.N., Jr.: Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58 (2004) 425-51.
- Parisot, D.; Dufresne, M.; Veneault, C.; Laugé, R; Langin, T.: *clal*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetic Genomics* 268 (2002) 139-151.

- Pellier, A.L.; Laugé, R.; Veneault-Fourrey, C.; Langin, T.: CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology*, 48(2003) 639-55.
- Prusky, D.; Yakoby, N.: Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* 4 (2003) 509-16.
- Ramon, A. M.; Porta, A.; Fonzi, W. A.: Effect of Environmental pH on Morphological Development of *Candida albicans* Is Mediated via the PacC-Related Transcription Factor Encoded by *PRR2*. *Journal of Bacteriology* 181(1999) 7524-30.
- Rollins, J.A.: The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 785-95.
- Rollins, J.A.; Dickman, M.B.: pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Appl Environ Microbiol* 67 (2001) 75-81.
- Shatkin, A. J.; Manley, J. L.: The ends of the affair: Capping and polyadenylation nature structural biology 7 (2000) 838-42.
- Sambrook, J, Fritsch, E.F., Maniatis, T.:Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S.; A.R., C.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–67.
- Shih, J.; Wei, Y; Goodwin, P.H.: A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene* 8(2000) 139-50.
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P.; Ullrich, R.C.: A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem* 119 (1982) 158-63.
- St. Leger, R. J.; Joshi, L., Roberts, D.: Ambient pH Is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol*, February 64(1998) 709-13.
- Suzuki, M.: SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.* 8 (1989) 797-804.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A.; Arst, H.N., Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor

mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. EMBO J 14 (1995), 779-790.

- Tilburn, J., Sanchez-Ferrero, J.C., Reoyo, E., Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. Genetics 171 (2005) 393-401.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G.; Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673-80.
- Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S.; Walton, J. D.: The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall – degrading enzyme expression and virulence on maize. Plant Cell 12 (2000) 237–47.
- Unkles, S.E.: Gene organization in industrial filamentous fungi, In Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi. Ed J.R. Kinghorn & G. Turner, Chapman & Hall, London. (1992) pp. 28-53.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr.; Penalva, M.A.: YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. Mol Cell Biol 23 (2003) 1647-55.
- Voigt, C.A., Schafer, W.; Salomon, S.: A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. Plant J 42 (2005) 364-75.
- Yakoby, N., Kobilier, I.; Dinoor, A.; Prusky, D.: pH Regulation of Pectate Lyase Secretion Modulates the Attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avocado Fruits. Applied and Environmental Microbiology 66(2000) 1026-30.
- Wattad C.; Kobilier D.; Dinoor A.; Prusky D.: Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. Physiological and Molecular Plant Pathology 50 (1997) 197-212.

CAPITULO III

SEQÜÊNCIA PARCIAL DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Colletotrichum lindemuthianum*

1. RESUMO

Um fragmento de DNA presente em alto número de cópias foi isolado da biblioteca genômica de *C. lindemuthianum*, utilizando-se a técnica de hibridização diferencial. Este fragmento de DNA, composto de 9.456 pb, corresponde à seqüência parcial do genoma mitocondrial de *C. lindemuthianum*. Nele estão presentes: a seqüência dos genes *cox3* e *nad6* e a seqüência parcial do gene *cox1*, todos relacionados à fosforilação oxidativa; dois genes que codificam rRNA's, *rns* e *rnl* (seqüência parcial), um conjunto de 12 genes de tRNA's; e uma ORF presente em um íntron do grupo I, que codifica uma endonuclease do tipo LAGLIDADG, envolvida no processo de *Homing*. O alinhamento de seqüências de proteínas demonstrou que Nad6 é menos conservada em relação a Cox1 e Cox3, em fungos filamentosos. O íntron do grupo I, detectado no fragmento de DNA analisado, possui alta homologia na seqüência nucleotídica com o íntron i8 do grupo I de *Podospora anserina*, sendo que ambos interrompem o gene *cox3* desses fungos na mesma posição. O conteúdo de A+T no genoma parcial de *C. lindemuthianum* é de 66%, atingindo a 69% para as regiões codificadoras de proteínas e reduzindo a 64% para os genes *rnl* e *rns*. Este alto conteúdo de A+T correlaciona-se com a utilização de códons preferenciais contendo A ou T na terceira posição do códon. Todos os genes que codificam proteínas, presentes no fragmento analisado, utilizam o códon de terminação TAA no lugar do códon universal TGA, que neste genoma codifica o aminoácido triptofano. A ordem dos genes *cox1-trn_(R)-rns-trn_(YT)-cox3-trn_(KGDS)^a-nad6-trn_(VKIS^bP)-rnl* é mais próxima de fungos da ordem Filacorales. A análise filogenética, baseada na seqüência concatenada das três proteínas Cox1, Cox3 e Nad6, possibilitou separar diferentes grupos de fungos, além de agrupar *C. lindemuthianum* na ordem Filacorales.

2. INTRODUÇÃO

Colletotrichum lindemuthianum, um Ascomiceto filamentosos, têm atraído atenção de vários pesquisadores por ser um excelente modelo em estudos de genética na busca por genes que lhe confere patogenicidade ao feijoeiro comum. Este patógeno leva à perda considerável na produtividade, que pode chegar a 100% quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença e cultivares suscetíveis são utilizadas (Somavilla & Prestes, 1999). Esta espécie é um excelente modelo para estudo da interação planta-patógeno devido à facilidade de seu cultivo em laboratório, bem como seu processo de infecção é composto por diferentes fases de nutrição, biotrófica e necrotrófica, além da diferenciação de estruturas especializadas durante a cinética de infecção (O'Connell et al., 1985; Latunde-Dada, 2001). Diferentes genes conferem patogenicidade ou virulência a este fitopatógeno, tais como os codificadores para os fatores de transcrição CLTA1 (Dufresne et al., 2000) e CLNR1 (Pelletier et al., 2003), a proteína cinase CLK1 (Dufresne et al., 1998), tetraspanina CIPLS1 (Veneault-Fourrey et al., 2005) e proteína relacionada ao transporte de vesículas CLPT1 (Siriputthaiwan et al., 2005). A análise molecular e testes de patogenicidade têm demonstrado uma grande variabilidade tanto de raças fisiológicas, quando as mesmas são inoculadas em diferentes cultivares de feijoeiro diferenciadoras, quanto genotípicas deste fitopatógeno, o que dificulta os programas de manejo da doença, melhoramento da resistência do feijoeiro e controle do patógeno (Fabre et al., 1995; Sicard et al., 1997; Freeman et al., 1998).

A análise filogenética de fungos baseia-se, principalmente, na análise de marcadores moleculares, como seqüências nucleares de rDNA, genes da tubulina ou da subunidade da RNA polimerase II-RPB1, nem sempre são capazes de determinar a filogenia de certos grupos de fungos com suporte significativo (Jensen et al., 1998; Liu et al., 1999; Berbee et al., 2000; James et al., 2000; Keeling et al., 2000). Em outros trabalhos, a relação filogenética de algumas espécies de fungos filamentosos em nível de Ordem é contraditória como, por exemplo, *Glomerella* (fase teleomórfica de *Colletotrichum*) (Jacobs et al., 2003; Silva-Wanderlei et al., 2003, Goodwin, 2004).

A utilização de seqüências de proteínas mitocondriais concatenadas tem sido essencial na obtenção de árvores filogenéticas mais robustas, capazes de resolver

incertezas na filogenia e sistemática de fungos (Forget et al., 2002; Bullerwell et al., 2003). A seqüência do mtDNA pode, também, ser aplicada em análises de variabilidade genotípica, dinâmica de populações e identificação de espécies, muitas vezes difíceis de serem diferenciadas tanto no grupo de fungos quanto em outros organismos (Ghimire et al., 2003; Ellis et al. 2005; Pantou et al., 2006).

O tamanho do genoma mitocondrial de fungos varia de 19,43 Kb em *Schysosaccharomyces pombe* (Bullerwell et al., 2003) a aproximadamente 100 Kb em *Podospora anserina* (Cummins et al., 1990). A grande variação apresentada por esses genomas pode ser explicada pela presença ou ausência de um grande número de íntrons do grupo I e, ou II, redução no conteúdo do número de genes e variação no tamanho das seqüências intergênicas (Bullerwell et al., 2003).

Os genomas mitocondriais de fungos compartilham várias características comuns. O mtDNA é caracterizado pelo alto conteúdo em AT e, conseqüentemente, resulta na utilização de códons preferenciais nos genes codificadores de proteínas (Bullerwell et al., 2003; Kouvelis et al., 2004; Pantou et al., 2006). Outra característica compartilhada entre os genomas mitocondriais é a manutenção de um conjunto básico de genes e a presença de grande número de íntrons do grupo I e, em menor número, íntrons do grupo II (Woo et al., 2003). Vários desses íntrons do grupo I são capazes de sofrer mobilização via processo chamado *Homing*, dependente de endonucleases codificadas por ORFs intrônicas (Haugen et al., 2005). Diferentemente do genoma nuclear, o genoma mitocondrial está presente em grande número de cópias na mitocôndria (Barr et al., 2005).

Neste trabalho, é descrita a seqüência de um fragmento de DNA de, aproximadamente, 9,5 Kb do genoma mitocondrial de *C. lindemuthianum*, o conteúdo e a organização de seus genes. Utilizando a seqüência de três proteínas concatenadas, é inferida a relação filogenética de *C. lindemuthianum* com outros Sordariomicetos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens e condições de cultura

Neste trabalho, foi utilizado o isolado LV49 (raça 81) do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, pertencente à micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças do Departamento de Biologia da UFLA. Esta linhagem foi mantida a 21°C em placas de Petri, contendo meio GPYECH sólido (Ansari et al., 2004).

3.2. Manipulações do DNA e construção de um banco genômico

O DNA total foi extraído a partir do micélio da linhagem LV49, conforme Specht et al. (1982). Clivagens parciais do DNA total foram realizadas com diferentes concentrações da enzima de restrição *Sau3A*, durante uma hora, para determinar a quantidade de enzima capaz de gerar maior número de fragmentos de DNA com tamanho desejado (9 a 12 Kb). As reações de hidrólise do DNA total foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As reações foram realizadas, utilizando-se tampões e temperaturas descritas pelo fabricante (Promega). Após a determinação da concentração ideal de enzima, 50 µg de DNA total foi digerido e a reação foi interrompida, após uma hora, por inativação térmica. O volume total da reação foi depositado sobre um gradiente de sacarose e, em seguida, procedeu-se o fracionamento dos fragmentos por centrifugação. Ao término da centrifugação, alíquotas foram devidamente coletadas em diferentes tubos e o tamanho dos fragmentos de DNA, presentes nos mesmos, foi estimado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Agrupou-se o conteúdo dos tubos contendo os fragmentos de DNA de tamanho desejado, sendo esses fragmentos purificados por precipitação e utilizados na reação de ligação com os braços do fago lambda EMBL3 (Stratagene), catalisada pela T4 DNA ligase. Após o empacotamento com Gigapack Gold II Packaging Extract (Stratagene), células de *Escherichia coli* XL1 Blue MRA (P2) (Stratagene) foram infectadas com os fagos recombinantes. Para a amplificação e determinação do título do Banco Genômico, foram utilizadas células de *E. coli* XL1 Blue MRA (P2), conforme as recomendações do fabricante (Stratagene).

3.3. Amplificação da região ITS do rDNA por PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região ITS (ITS1/ITS4) do rDNA de *C. lindemuthianum* foram descritos por White et al. (1990). Os parâmetros de amplificação foram: 40 ciclos, cada ciclo consistindo de um passo de desnaturação a 94°C por 1 min, um passo de pareamento a 50°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 1 min e 30 s. Ao final, foi feito um passo de extensão final a 72°C por 7 min.

3.4. Seleção de DNA repetitivo a partir do banco genômico e hibridizações

Uma hibridização diferencial foi utilizada para o isolamento de seqüências repetitivas a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum* de acordo com Hamer et al. (1989). O isolamento de fagos recombinantes, contendo seqüências de DNA repetido, foi realizado por hibridizações de placas de lise, segundo Benton & Davis (1977). Os fagos foram transferidos para membranas que foram utilizadas em duas hibridizações.

Primeiramente, utilizou-se 500 ng de DNA total de *C. lindemuthianum* marcado com o kit CPD-Star (Amersham Bioscience). Após a detecção dos sinais de hibridização utilizando o Kit “CDP-Star™ Detection Module” (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as recomendações do fabricante, as membranas foram recuperadas e novamente hibridizadas com um fragmento do ITS, obtido por PCR, e marcado da mesma forma. As hibridizações foram realizadas como descrito por Sambrook et al. (1989) ajustando o tempo de hibridização para 6 h. A detecção das placas de lise, que hibridizaram com as sondas, foi realizada empregando o kit citado anteriormente.

As placas de lise com sinal positivo para o DNA total marcado e negativas para o rDNA foram eluídas do meio de cultura e purificadas. Procedeu-se a extração de DNA desses fagos segundo metodologia descrita por Felipe et al. (1992). O DNA purificado foi hidrolisado com a enzima *SalI*. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de náilon, e hibridizados (tempo de hibridização de apenas 3h) com DNA total marcado nas mesmas condições utilizadas para o isolamento da placa de lise. Fragmentos positivos foram clonados no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene®), previamente digerido com *SalI*.

3.5. Sequenciamento e análise das seqüências

O DNA foi seqüenciado pelo procedimento de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977), usando o kit ¹⁷Sequencing (Pharmacia Biotech S.A., Saint Quentin-en-Yvelines, Roissy, France) ou o kit ABI PRISM (Perkin Elmer, Roissy, France) e diferentes oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1). Oligonucleotídeos de ambos os lados do fragmento de DNA foram desenhados para avançar no seqüenciamento do mesmo (Tabela 1).

A determinação do conteúdo de GC e do uso de códons preferenciais foram realizadas no programa DNAMAN. A busca por seqüências homólogas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi realizada utilizando-se os programas Blastn e Blastp (Altschul et al., 1997). O programa Bioedit (Hall, 1999) foi utilizado para a tradução de seqüências obtidas. Domínios conservados nas seqüências polipeptídicas foram pesquisados no site Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), disponibilizado pelo Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) e pelo programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). Os tRNA's foram identificados por meio do programa tRNAscan-SE 1.21 (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/>), conforme os parâmetros para o DNA mitocondrial.

3.6. Análises filogenéticas

As seqüências de aminoácidos das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6, obtidas neste trabalho e de outros organismos coletados no banco de dados do GenBank foram utilizadas para determinar as relações filogenéticas de *C. lindemuthianum* com demais fungos. Os alinhamentos de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram feitos por meio do programa ClustalW (Thompson et al., 1994) e formatados no Bioedit. Árvores filogenéticas foram obtidas pela análise filogenética, utilizando-se seqüências concatenadas das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6 de diversos fungos, pelo método do Vizinho mais Próximo, utilizando-se o programa MEGA3 (Kumar et al., 2004).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no seqüenciamento do mtDNA de *C. lindemuthianum*

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' →3')
R	GCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGC
F	CGTGCACGAAGACGGGGGTCCC
O14Fa	ATACATCATTTTTTGAAACAGCT
O14Fb	CGTTTTATTTAAGCAGGTATT
O14Fc	ATAGGAATGGTTTACGCTATGA
O14Fd	AAAAGAATTTCTTATTAGATAA
O14Fe	GAAAAGCTTATACCTACCCTA
O14Ra	CCCTCACGATAATCATAGAAT
O14Rb	GATTTGATATTTTACTATTGA
O14Rc	TGTACCCTTATACAGGGAATGT
O14Rd	AAGCGTATATTCTTCATAATCCTA
O14Re	CTAAAAAAGCCGCCCTTAAAGGA
O14Rf	AACCACAGTTTCACAACATTA

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de DNA repetitivo

Após a reação de empacotamento dos fagos recombinantes, foi obtida uma biblioteca genômica cujo título foi $1,09 \times 10^6$ UFP/mL. A probabilidade de encontrar uma seqüência única no genoma, nesta biblioteca, é maior que 0,9, calculada a partir da equação de Clarke e Carbon (1976). A técnica de hibridização diferencial possibilitou o isolamento de sete fagos recombinantes da biblioteca genômica. A hidrólise com *SalI* do DNA desses fagos, enzima que libera os braços do fago λ , demonstrou que todos eles continham diferentes fragmentos do DNA de *C. lindemuthianum* (Figura 1A). A hibridização desses fragmentos, utilizando o DNA total de *C. lindemuthianum* como sonda, revelou que o fago F7 não continha seqüências de DNA repetitivo pela ausência de fragmentos hibridizados, o que demonstrou a validade desta técnica para o isolamento de DNA presente em alto número de cópias. Diferentemente, fragmentos gerados da clivagem dos outros seis fagos hibridizaram com o DNA total marcado (Figura 1B). A hibridização diferencial não permitiu eliminar todos os fagos contendo DNA ribossomal. A análise dos produtos de PCR, utilizando DNA dos fagos e os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 (Tabela 1) para DNAr, revelou que os fagos F5 e F19 continham seqüências desse DNA repetitivo (Figura 1C). Os fragmentos de DNA dos fagos F2, F6, F12 e F14 foram clonados para posterior seqüenciamento.

4.2 Análise da seqüência do fragmento de DNA F14.1

4.2.1. Conteúdo gênico

O maior fragmento de DNA gerado pela clivagem do DNA do fago 14 com *SalI* foi denominado F14. Após seu seqüenciamento, utilizando-se diferentes oligonucleotídeos (Tabela 1), foi obtida uma seqüência de 9.456 pb. Este fragmento é parte do DNA mitocondrial de *C. lindemuthianum*, devido à sua homologia com seqüências mitocondriais de diversos fungos filamentosos como *Verticillium dahliae* (DQ351941.1) e *Fusarium oxysporum* (AY874423.1).

O conteúdo de A+T neste fragmento foi 66%, chegando a 69% para as regiões codificadoras de proteínas, sendo menor (64%) para os genes *rnl* e *rns*, que constituem a maior e a menor subunidade do ribossoma mitocondrial, respectivamente. Além desses genes, o fragmento F14.1 codifica para 12 RNA's transportadores (tRNA); a subunidade 3 da citocromo oxidase, *cox3*; subunidade 6 da enzima NADH desidrogenase, *nad6*, além da seqüência parcial da subunidade 1 da citocromo oxidase, *cox1*. Uma ORF, capaz de codificar uma endonuclease da família LAGLIDADG, foi detectada no intron do grupo I interrompendo o gene *cox1* (Figura 2).

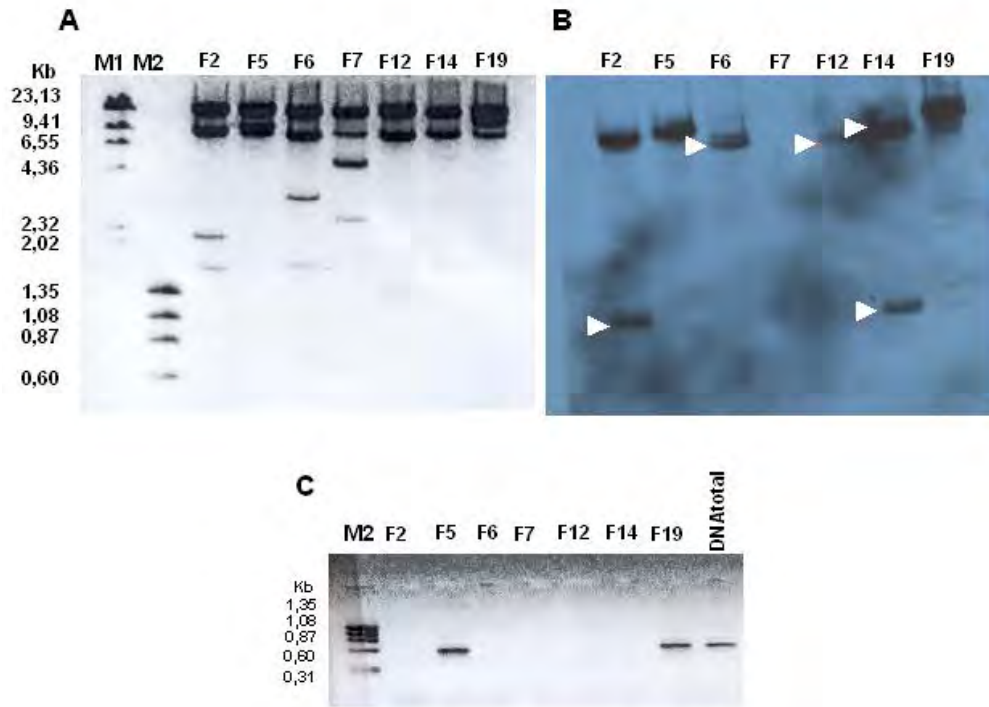


Figura 1. Análise dos fagos isolados pela hibridização diferencial. **A:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA dos fagos recombinantes F2, F5, F6, F7, F12, F14 e F19 clivados com a enzima *SalI*. O padrão de restrição demonstra que esses 7 fagos são todos diferentes entre si. **B:** Auto-radiografia da hibridização desses fragmentos com o DNA total de *C. lindemuthianum* utilizado como sonda. O tempo de hibridização foi reduzido para apenas 3 h. Com exceção do fago 7, os outros fagos recombinantes possuem possíveis seqüências de DNA repetitivo que hibridizaram com a sonda marcada. Setas indicam os fragmentos clonados para seqüenciamento **C:** Resultado da amplificação dos DNA's dos fagos recombinantes com os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 específicos para rDNA. A partir do DNA dos fagos F5 e F19 pode-se obter um fragmento do mesmo tamanho observado no DNA total de *C. lindemuthianum* utilizado como controle, o que indica que nesses fagos estão presentes seqüências do rDNA. M1 e M2 são marcadores de tamanho λ /*HindIII* e Φ X174/*HaeIII*.

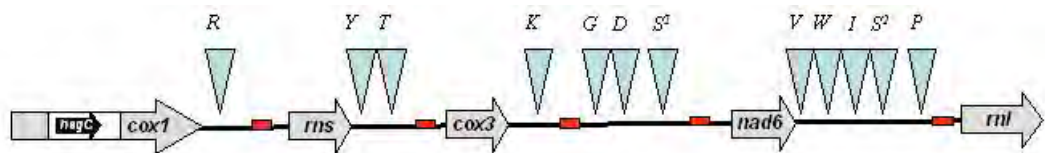


Figura 2. Mapa físico parcial do mtDNA de *C. lindemuthianum*. As setas cinzas e escura indicam o sentido da transcrição dos genes e da ORF intronica, respectivamente. O retângulo claro identifica o íntron do grupo I, que interrompe a seqüência do gene *cox3*. Triângulos verdes demonstram os 12 genes de tRNA's capazes de transportarem os aminoácidos R: Arginina, Y: Tirosina, T: Treonina, K: Lisina, G: Glicina, D: Aspartato, S¹: Serina, V: Valina, W: Triptofano, I: Isoleucina, S²: Serina e P: Prolina. Os retângulos vermelhos indicam possíveis elementos reguladores.

4.2.2. Seqüências codificadoras

A tradução de uma seqüência de 1.383 pb resultou em um polipeptídeo de 460 aminoácidos com alta identidade à subunidade I (Cox I) do complexo enzimático Citocromo Oxidase C. Este complexo é composto por várias cadeias polipeptídicas, presentes na membrana interna da mitocôndria de eucariotos e envolvida com a geração de energia nessa organela. Os valores de identidade (92%) e similaridade (96%) com a proteína Cox1 de *F. oxysporum* (AAX21832) demonstram um alto grau de conservação na seqüência de aminoácidos, confirmado pelo alinhamento feito com a seqüência obtida neste trabalho com a proteínas Cox1 de alguns fungos do grupo Pezizomicotina (Figura 3). Cox1 de *Hypocrea jecorina* demonstra maior diferença pela inserção de determinadas seqüências de aminoácidos, ausentes nos demais fungos analisados. O fragmento de DNA 14.1 possui, apenas, a seqüência parcial do gene *cox1*, faltando a região codificadora do N-terminal da proteína. O gene *cox1* de *C. lindemuthianum* é interrompido por, pelo menos, um intron do grupo I de 1.533 pb, denominado i1, inserido entre os aminoácidos F e W (Figura 3). O éxon anterior ao íntron termina com uma timina (T) e a seqüência terminal do intron contém uma guanina (G) característica deste grupo. Dentre os genes mitocôndrias, *cox1* é frequentemente interrompido por íntrons do grupo I, em fungos filamentosos e leveduras. O número desses íntrons pode variar de zero, em fungos como *Verticillium dahliae* (Pantou et al., 2006) e *Lecanicillium muscarium* (Kouvelis et al., 2004) a até mesmo 16 em *P. anserina* (Cummings et al., 1990, citado por Gonzáles, 1998). Os íntrons do grupo I, assim como os do grupo II, são caracterizados pela capacidade de sofrerem auto-processamento e, conseqüentemente, a sua presença é praticamente neutra para o organismo.

O alinhamento da seqüência nucleotídica de i1 e do íntron do grupo I i8 do gene *cox1* de *P. anserina* demonstrou que eles estão inseridos na mesma posição do gene *cox1*, bem conservada entre estes dois organismos (dados não apresentados). A presença de íntrons do grupos I e II, em um determinado sítio dentro do gene, pode ser o resultado da sua transferência vertical ou horizontal, *homing* e transposição (Gray, 1998; Cho et al., 1998; Kurokawa et al., 2005; Haugen et al., 2005). A transferência horizontal de íntrons do grupo I pode ocorrer até mesmo entre grupos distantes filogeneticamente, como fungos e plantas (Cho et al., 1999).

Homing é um processo pelo qual um íntron, presente num gene, invade um alelo que não apresenta o mesmo numa posição homóloga. O mecanismo de mobilidade dos íntrons do grupo I via *homing*, necessita da ação de endonucleases homing (HE), capazes de clivar o DNA dupla fita em sítios específicos. Íntrons, que se espalham pelo mecanismo *homing*, possuem em sua seqüência ORF's codificando HE's. Assim como no i8, o íntron presente em *cox1* de *C. lindemuthianum* contém uma ORF de 1.011 pb capaz de codificar uma proteína de 336 aminoácidos homóloga a endonucleases do tipo HE, especificamente da família LAGLIDADG. A ORF está inserida na alça P1 desse íntron. A análise de possíveis domínios demonstrou que a proteína deduzida possui dois motivos LAGLIDADG, separados por 110 resíduos de aminoácidos, com um ponto isoeletrico teórico de pI 9,52 e massa molecular 38,9 kDa, características compartilhadas com as demais proteínas pertencentes a esta família (Jurica et al.,1999). A análise filogenética de diferentes proteínas HE's, da família LAGLIDADG, codificadas por íntrons do grupo I, demonstrou que a proteína HE de *C. lindemuthianum* é mais próxima das proteínas codificadas pelos intron i8 de *P. anserina* e i1 de *Ophiostoma ulmi* (dados não mostrados).

Outra ORF de 810 pb está presente no fragmento de DNA 14.1. Sua tradução gera uma proteína de 269 resíduos de aminoácidos, cuja seqüência é homóloga à subunidade III da citocromo oxidase de fungos filamentosos, apresentando a maior identidade (78%) e similaridade (91%) na seqüência primária com a proteína CoxIII de *F. oxysporum* (AAX21837). A proteína deduzida contém um domínio altamente conservado na família de proteínas CoxIII, segundo análise utilizando-se o banco de dados Pfam. Este resultado é confirmado pelo alinhamento de algumas proteínas desta família pertencentes a diferentes fungos (Figura 4). Apenas uma pequena região próxima à região C-terminal demonstra menor conservação dos resíduos de aminoácidos. A ORF do gene *cox3* em *C. lindemuthianum* não é interrompida por íntron, assim como seus homólogos descritos nos fungos Pezizomicotina.

Uma última ORF, contendo 696 nucleotídeos, foi detectada no fragmento de DNA mitocondrial de *C. lindemuthianum*. Foi obtido um polipeptídeo, contendo 231 aminoácidos, cuja seqüência primária tem homologia com a subunidade VI do complexo enzimático NADH desidrogenase de fungos, apresentando 64% de identidade e 75% de

similaridade com a subunidade 6 (Nad6) da NADH desidrogenase de *V. dahliae* (YP_667830). O alinhamento da seqüência de proteínas Nad6 revelou que a mesma é menos conservada entre diferentes fungos, em relação às proteínas CoxI e CoxIII (Figura 5).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140     150
      .:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.
C.lindemuthianum 1  -----MGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
V.dahliae         1  -----MGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
P.anserina       1  -----MSGGVSIMERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
N.crassa         1  -----MSSISIMERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
T.rubrum        1  -----MGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
E.floccosum     1  -----MGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
A.tubingensis  1  KYIITIKRQFSTTSEKKEDVASLKSQESSTFFTLKQPTWGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
P.marneffei     1  -----MVGKLSPLEGSPRIERQFSTINDNSFISLKNPSEGERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
L.muscarium     1  -----MSGGIERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
H.jecorina      1  -----MPILYFFKILRFQKEEGLNLNLRSSQSMNERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
M.anisopliae    1  -----MILITNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
F.oxysporum     1  -----MSGGIERNFLSTNAKDIGTLYLIFALFSGLLGTAFSVLIRLELSGPGVQYIADNQLYNSIITAHAILMIFFMVMPALIGGFGNFMPLMVGPGDPAFPRLNNISFWLLPSSL
Clustal Consensus
                                     *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

```

      160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
      .:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.
C.lindemuthianum 41  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
V.dahliae        112  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
P.anserina      118  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
N.crassa        117  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
T.rubrum       112  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
E.floccosum    112  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
A.tubingensis  150  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
P.marneffei    145  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
L.muscarium    115  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
H.jecorina     140  LLVFSACIEGGAGTGWTLKDKYYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
M.anisopliae   107  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
F.oxysporum    114  LLVFSACIEGGAGTGWTLYPPLSGQSHSGSPVDLAIFALHLSGIVSSLLGAINFITTVNMRTPGIRLHKLALFGWAVNI--TAVLLLLSLPVLAGGITMILTDRNFNTSFFENAGGGDPIILFQHLFWFFGHPEVYILIIPGFGII
Clustal Consensus 40  *::: **.*.***** **.*.:***** **.*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:

```

```

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440     450
      .:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.
C.lindemuthianum 185  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
V.dahliae        256  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
P.anserina      262  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
N.crassa        261  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
T.rubrum       256  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
E.floccosum    256  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
A.tubingensis  294  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
P.marneffei    289  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
L.muscarium    259  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
H.jecorina     281  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNSERLKERHRYSPDLLVKEAYHVVVNRKYLTLIHHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
M.anisopliae   253  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
F.oxysporum    258  STTISANSNKIFGYIGMAYAMMSIGILGFIVNS-----HHMYTVGLDVTTRAYFTAATLIIAVPTGKIFSWLATCYGGSIMLTPSMLFALG-FVFMFTIGGLS-----GV
Clustal Consensus 152  **:::*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:*.:.:

```

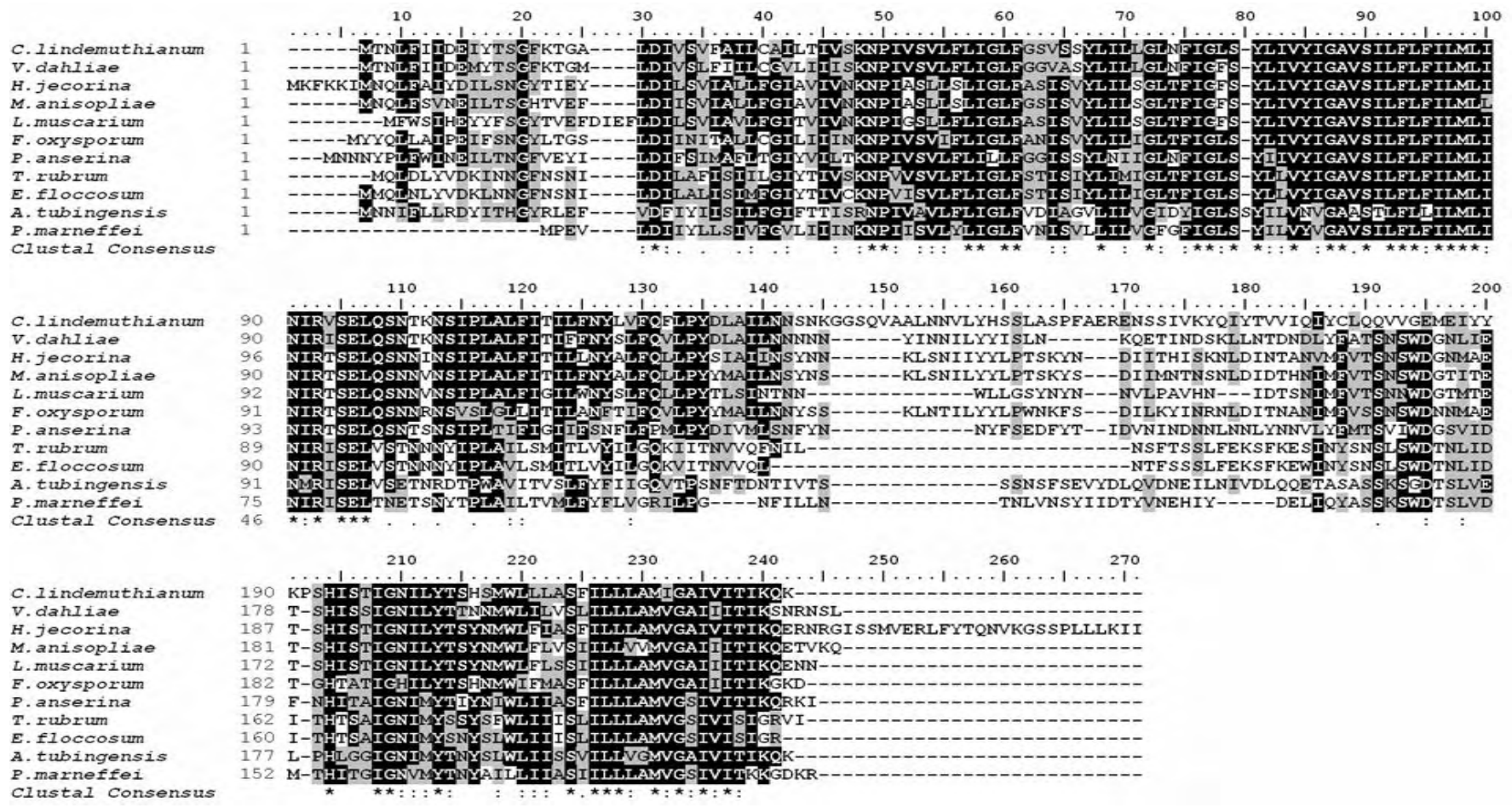



Figura 5. Alinhamento das seqüências de proteínas Nad6 de diversos fungos e de *C. lindemuthianum*. Seqüências do GenBank: *V. dahliae* (NC_008248); *P. anserina* (NC_001329); *F. oxysporum* (AY945289); *L. muscarium* (NC_004514); *P. marneffei* (NC_005256); *E. floccosum* (NC_007394); *T. rubrum* (Q36836); *M. anisopliae* (NC_008068); *A. tubingensis* (NC_007597); *H. jecorina* (NC_003388) e *C. lindemuthianum* (seqüência não depositada).

4.2.3. Genes que codificam tRNA

Similar a vários outros fungos, o DNA mitocondrial de *C. lindemuthianum* codifica tRNA's. A utilização do programa tRNAscan-SE 1.21 detectou 12 tRNA's no fragmento de mtDNA F14.1, envolvidos no transporte dos aminoácidos arginina (R), tirosina (Y), treonina (T), lisina (K), glicina (G), aspartato (D), serina (S), valina (V), triptofano (W), isoleucina (I) e prolina (P)(Figura 2). O tamanho desses tRNA's varia entre 65 (trnT) e 86 nucleotídeos (trnY). Eles distribuem-se em conjuntos de 2, 4 e 5 tRNA's, restando o trnR como gene isolado. As estruturas primárias desses tRNA's podem ser dobradas na estrutura secundária típica chamada “trevo de 4 folhas” com várias características conservadas em RNA's transportadores (Tabela 2). Pares de bases diferentes do padrão Watson-Crick estão presentes nos tRNAs trnY e trnT e estão localizados nos braços acceptor e TΨC, respectivamente. Estes pareamentos raros não são capazes de introduzir distorções significantes nas hélices (Holbrook et al., 1991). Nenhum dos genes para os 12 tRNA's codifica o terminal 3' CCA, que pode ser adicionado após a transcrição dos mesmos.

Análises de homologia via BlastN e subsequente alinhamento pelo ClustalX, utilizando seqüências de Sordariomicetos, identificaram os genes codificadores dos RNA's ribossomais da subunidade maior *rnl* e da subunidade menor *rns* do ribossoma mitocondrial. O gene *rns* tem 1.445 pb, não sendo possível determinar o tamanho do gene *rnl*, pois ele está presente no terminal 3' do fragmento clonado. O conteúdo de A+T do gene *rns* e da seqüência parcial do gene *rnl* (64%) é menor do que o conteúdo dos genes codificadores para proteínas que atinge 69%.

O gene *rns* de *C. lindemuthianum* tem alta conservação na seqüência de nucleotídeos, em relação às seqüências parciais de *rns* de diversos isolados de *Glomerella cingulata* (AF411747.1), *Glomerella acutata* (AF411776) e *Colletotrichum dematium* (AF411740). A maior conservação de nucleotídeos de *rnl* foi com *V. dahliae* (DQ351941) e *Hypocrea jecorina* (AF447590). Nenhuma seqüência do gene *rnl* mitocondrial de *Glomerella* ou *Colletotrichum* foi depositada nos bancos de dados públicos.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos 12 genes de tRNA's encontrados no genoma mitocondrial parcial de *C. lindemuthianum*.

tRNA	BRAÇO AMINOACIL		BRAÇO D				BRAÇO ANTICODON			BRAÇO EXTRA	BRAÇO TΨC			BRAÇO AMINOACIL	
	Haste		Haste	Alça	Haste	Haste	Alça	Haste	Haste		Alça	Haste	Haste		
Consenso	NNNNNNN	TN	NYNN	AR(N)GG(N)A	NNRN	D	NNNNN	<u>YT(N)_{codon}</u> RN	NNNNN	(N) _n Y	NNNNG	TTCRANY	CNNNN	NNNNNNN	N
R (TCT)	GTCTCAT	TA	GCTC	AATGGTA	GAGC	A	GAATA	<u>CTICTAA</u>	TATTC	TGAT	TCTAG	TTCGAAT	CTGGA	ATGAGAT	T
Y (GTA)	GGAGAGT	TC	CTTT	ATTGGCAAA	AAGG	G	TTGAG	<u>CTGTAAA</u>	CTCAA	TAGCAATTTTCTGCTTT	AAGAG	TTCGAAT	CTCTT	GTGCTCC	T
T (TGT)	GCTCTTA	TA	GCTC	AACGGTA	GAGC	A	TAATA	<u>CTGTA</u>	TATTA	TGA	AGAG	TCGATT	CCTT	TAAGGGC	G
K (TTT)	GGGATTT	TA	GTAT	AATGGTGA	ATAC	A	TATGA	<u>CTTTTAA</u>	TCATA	TAAGAT	ATTGG	TTGGAAT	CCAGT	AGATCCT	A
G (TCC)	ACGGTTA	TC	ATTT	AATGGTA	GGAT	T	GCTGT	<u>CTTCCAA</u>	ACAGC	AGTGT	GTTGG	TTCGATT	CCGAC	TAACCGT	A
D (GTC)	GAACTAA	TA	GCTT	AATTGGTA	AAGC	A	TTTTT	<u>CTGTAC</u>	GAAAA	GGGAT	GTCGG	TTCGATG	CCGAC	TTAGTTC	G
S (GCT)	GGAAAGG	TA	GCC	ATAGGTAG	GGC	A	GATAT	<u>TTGCTAA</u>	ATATT	GTGTGAAAACATTT	GGGCG	TTCGAAT	CGTCT	TCTTCC	G
V (TAC)	AAGGGAT	TA	GCTC	AATGGTA	GAGC	A	ACCGT	<u>TTTACAC</u>	ACGGT	AGGTT	AAGTG	TTCGAGT	CACTT	ATTCCTT	A
W (TCA)	AAGAGTA	TA	GTTT	AATGGCA	AAAC	A	AGGAG	<u>CTTCAAC</u>	CTCCT	GAATT	CTTAG	TTCGAGT	CTGAG	TACTCTT	G
I (GAT)	AATCTT	TA	ACTT	AACGGTA	AAGT	G	CATTT	<u>TTGATAA</u>	GAATG	AAAT	CCAAG	TTCGATT	CTTGG	AAGAATT	A
S (TGA)	AGAGAAT	TG	ACT	GAGTGGTTAA	AGT	G	CCGGC	<u>CTTGAGT</u>	GCTGG	TATGGGGTTCCCCCATC	ATGGG	TTCGAAT	CCCAT	ATTCTCT	G
P (TGG)	CAGATTA	TG	GCC	GGTTGGTTA	GGC	G	CTCCT	<u>TTTGGGA</u>	AGGAG	AATAG	TTGCG	TTCGAAC	CGCAA	TAATCTG	A

Os tRNA's foram detectados com o auxílio do programa tRNAscan-SE 1.21. A linha denominada consenso demonstra a posição de nucleotídeos conservados na seqüência de um tRNA. Os anticódons estão destacados por letras sublinhadas.

4.2.4. Possíveis elementos reguladores

Todos os genes codificando proteínas ou RNA's são transcritos na mesma direção, assim como os genes mitocôndrias de outros fungos como *H. curvatum* (Forget et al., 2002), *Monoblepharella15* e *Harpochytrium94* (Bullerwell et al., 2003); *P. manerffei* (Woo et al., 2003), *L. muscarium* (Kouvelis et al., 2004) e *V. dahliae* (Pantou et al., 2006). Trabalhos concernentes à determinação experimental dos elementos reguladores da transcrição no genoma mitocondrial são ainda escassos. Alguns desses elementos foram determinados para as leveduras *Schysosaccharomyces pombe* (consenso WTATATGTR) e *Saccharomyces cerevisiae* (consenso YTATAAAGTA) (Schäfer, 2005) e no fungo filamentoso *Neurospora crassa* (consenso TTAGWRRKSNH, precedida de 15-27 pb rica em AT) (Kubelik et al., 1990). A partir destas seqüências, foi realizada uma busca por possíveis elementos reguladores no fragmento de mtDNA 14.1. Foram detectadas cinco seqüências similares ao consenso de *N. crassa* presentes na região -35 pb do gene *rns* ((A/T)_{rico} TTAGTGATGTA), -68 pb do *cox3* (TTAGAGGTTAA), -35 pb do *trnG* ((A/T)_{rico} TTAGTGATAGA), -53 pb do gene *nad6* (TTAGTGTTAGGA) e -41 pb do gene *rnl* (ATAGAAATGTA) (Figura 1). Seqüências similares foram descritas para os genes *cox3*, *cox2*, *cox1* e *nad4* de *L. muscarium* (Kouvelis et al., 2004) e para outros genes, como *rns*, *rnl* e alguns *trn* no genoma mitocondrial de *V. dahliae* (Pantou et al., 2006). Interessantemente, os prováveis elementos regulatórios nos genes *rns* de *V. dahliae* e *C. lindemuthianum* são similares em seqüência e posicionamento. Duas seqüências similares ao consenso de promotores em *S. cerevisiae* foram identificadas na região 5' do gene da HE nas posições -255 pb (AATAAGTA) e -192 pb (TATAAGAT). Mas, essas seqüências estão sobrepostas com o final do gene *cox1*. Alguns genes mitocondriais de *N. crassa* são cotranscritos a partir de uma seqüência promotora, como o bloco *rns-tRNA's-cox3-nad6* (Kubelik et al., 1990), sendo que o genoma mitocondrial de *S. pombe* é transcrito em, apenas, dois RNA's (Paquin et al., 1997).

O posicionamento das seqüências promotoras em relação à organização dos genes mitocondriais em *C. lindemuthianum* fornecem um indicativo de que a transcrição ocorre de forma policistrônica, sendo os genes co-transcritos. Obviamente esta hipótese, além da possível função sugerida para os cis elementos, precisa ser comprovada.

4.2.5. Uso de códons preferenciais

A tradução das seqüências codificadoras no fragmento de mtDNA 14.1 foi realizada utilizando-se o código 4 que possui algumas variações em relação ao código universal (Fox, 1987). A tradução das proteínas Cox3, Nad6 e He inicia-se com o códon de iniciação padrão ATG, enquanto o término é marcado pelo códon TAA, preferencialmente utilizado na tradução de genes mitocondriais de fungos (Paquin et al., 1997), inclusive para a proteína Cox1. Os aminoácidos mais freqüentes nestas quatro proteínas são leucina (L:163), isoleucina (I:133), serina (S:112), glicina (G:108) e fenilalanina (F:104). Este resultado demonstra que, com exceção da serina, aminoácidos com cadeias hidrofóbicas são preferidos, o que está relacionado à localização na membrana plasmática das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6. Os genomas mitocondriais de fungos filamentosos, assim como o fragmento de mtDNA analisado neste trabalho, possuem alto conteúdo de A+T. Esta característica é, parcialmente, responsável pela derivação do código genético, utilizado pela maquinaria de tradução da mitocôndria, refletindo-se na preferência do uso de códons ricos em A e T (Tabela 3). Códons contendo, exclusivamente, A e T são os mais utilizados, em preferência aos códons ricos em C e G. Vários códons não foram utilizados (CTC, CTG, CCG, TAG, TGG e CGC) na codificação das proteínas, ou apareceram uma única vez (GTC e ACC) enquanto outros foram utilizados em baixa freqüência (TTG, TCC, TCG, ACG, GCG, AAG, CGG, AGG, AGC e GGC). Uma característica de todos estes códons é a presença de C ou G na última base. Quando se compararam os diferentes códons para o mesmo aminoácido, nota-se novamente que os códons preferencialmente utilizados são aqueles contendo A ou T na terceira posição, reflexo da alta porcentagem de A+T nas seqüências codificadoras (69%). A freqüência de A ou T na terceira base dos códons chega a 82%, de acordo com a análise de todos os códons utilizados na codificação das quatro proteínas analisadas. O aminoácido triptofano (W) no código 4 de tradução pode ser codificado pelos códons TGA ou TGG, sendo que, no código universal, TGA é utilizado como códon de término da tradução.

Na mitocôndria de *C. lindemuthianum*, assim como para fungos filamentosos e outros organismos, o aminoácido W é codificado pelo códon TGA na tradução das proteínas Cox1, Cox3, He e Nad6. Os 5 genes *trnA*, *trnT*, *trnK*, *trnV* e *trnW* possuem anticódons que, coincidentemente, são capazes de parear com os códons mais utilizados para esses aminoácidos. Os códons preferenciais para os aminoácidos

Y, D, S e I podem ser lidos pelos *trnY*, *trnD*, *trnS*¹ e *trnI* mediante a presença da base G na primeira posição do anticódon. Como o seqüenciamento do genoma mitocondrial completo de *C. lindemuthianum*, ainda não foi realizado, não é possível afirmar se este genoma é capaz de codificar todos os tRNA's necessários na tradução de proteínas encontradas na mitocôndria.

Tabela 3. Códonos utilizados na tradução dos genes mitocôndrias de *C. lindemuthianum* presentes no fragmento de mtDNA 14.1.

CODON/aa	TOTAL	CODON/aa	TOTAL	CODON/aa	TOTAL	CODON/aa	TOTAL
TTT F	73	TCT S	28	TAT Y	67	TGT C	82
TTC F	27	TCC S	4	TAC Y	33	TGC C	18
TTA L	74	TCA S	14	TAA *	100	TGA W	100
TTG L	7	TCG S	5	TAG *	0	TGG W	0
CTT L	10	CCT P	63	CAT H	82	CGT R	10
CTC L	0	CCC P	18	CAC H	18	CGC R	0
CTA L	9	CCA P	20	CAA Q	90	CGA R	6
CTG L	0	CCG P	0	CAG Q	10	CGG R	3
ATT I	32	ACT T	35	AAT N	75	AGA R	71
ATC I	10	ACC T	1	AAC N	25	AGG R	10
ATA I	58	ACA T	58	AAA K	94	AGT S	38
ATG M	100	ACG T	6	AAG K	6	AGC S	10
GTT V	39	GCT A	57	GAT D	74	GGT G	44
GTC V	1	GCC A	11	GAC D	26	GGC G	2
GTA V	46	GCA A	29	GAA E	73	GGA G	39
GTG V	14	GCG A	3	GAG E	27	GGG G	16

Números indicam a preferência (em %) do uso dos códonos de um determinado aminoácido, quando foram analisadas as seqüências *cox1*, *cox3*, *nad6* e *heg* concatenadas. * - códonos de parada

4.2.6. Ordem dos genes do genoma mitocondrial parcial de *C. lindemuthianum*

Os genomas mitocondriais de fungos, completamente seqüenciados, demonstram que existem variações no conteúdo de genes nesses diferentes organismos. Por exemplo, nas leveduras *S. pombe*, *Schizosaccharomyces octosporus* e *Schizosaccharomyces japonicus*, os genes codificadores das subunidades do complexo HADH desidrogenase estão ausentes completamente (Bullerwell et al., 2003). Apesar desta discrepância, um conjunto básico de genes está presente em todos os genomas mitocondriais disponíveis no banco de dados públicos, sendo que a ordem desses genes tem-se revelado uma boa ferramenta útil nas discussões das relações filogenéticas. A sintenia desses genes mitocondriais é menos conservada em fungos (Kouvelis et al., 2004), contrastando com as observações em genomas de metazoários (Thao et al., 2004). Apesar da baixa conservação verificada em fungos,

dois blocos de sintenia compostos pelos genes *nad1-nad4-atp8-atp6* e *rns-cox3-nad6-rnl* foram característicos dos fungos Pezizomicotina (Kouvelis et al., 2004). Recentemente, a inserção dos genes mitocondriais de *V. dahliae* nesta análise possibilitou a dedução de quatro blocos de sintenia presentes nas Ordens da classe Sordariomycetos, denominados *rnl-trn₍₁₁₋₁₂₎*, *nad4L-nad5-cob-cox1*, *nad1-nad4-atp8-atp6* e *rns-trn₍₁₋₅₎-cox3-trn₍₁₋₅₎-nad6-trn₍₂₋₅₎* (Pantou et al., 2006). Neste trabalho, foi determinado que o genoma mitocondrial de *C. lindemuthianum* possui uma região conservada *cox1-trn_(R)-rns-trn_(YT)-cox3-trn_(KGDS^a)-nad6-trn_(VKIS^bP)-rnl* (Figura 1). Esta ordem de genes é mais próxima de *V. dahliae* (classificado na ordem Filacorales) (Pantou et al., 2006) que os representantes da ordem Hipocreales. Pantou et al. (2006) propõe que a diferença entre Filacorales dos Hipocreales seja o deslocamento do bloco *nad1-nad4-atp8-atp6-rns-cox3-nad6* para a posição entre os genes *nad3* e *atp9* (Figura 6). De acordo com os dados da literatura e os resultados obtidos neste trabalho, a sintenia observada em *C. lindemuthianum* pode ter-se originado devido ao deslocamento do bloco *nad1-nad4-atp8-atp6* para a região entre os genes R- *nad4L* a partir do padrão, observado em Hipocreales, ligando os genes *cox1* e *rns* (Figura 6). Esta hipótese é baseada no fato de o bloco *nad4L-nad5-cob-cox1* estar entre dois *trnR* isolados de outros *trn* no genoma dos Hipocreales. Conforme proposto por outros autores, genes flanqueados por *trn*'s podem atuar de forma similar a elementos transponíveis, com os dois tRNA's correspondendo aos longos terminais repetidos (LTR's), cada um contendo pequenas seqüências invertidas em seus terminais (alça do braço aceptor) (Saccone et al., 2002). O seqüenciamento do genoma mitocondrial completo de *C. lindemuthianum* poderá elucidar o rearranjo, que ocorreu nesta espécie e os possíveis mecanismos que o determinaram.

SORDARIOMICETOS

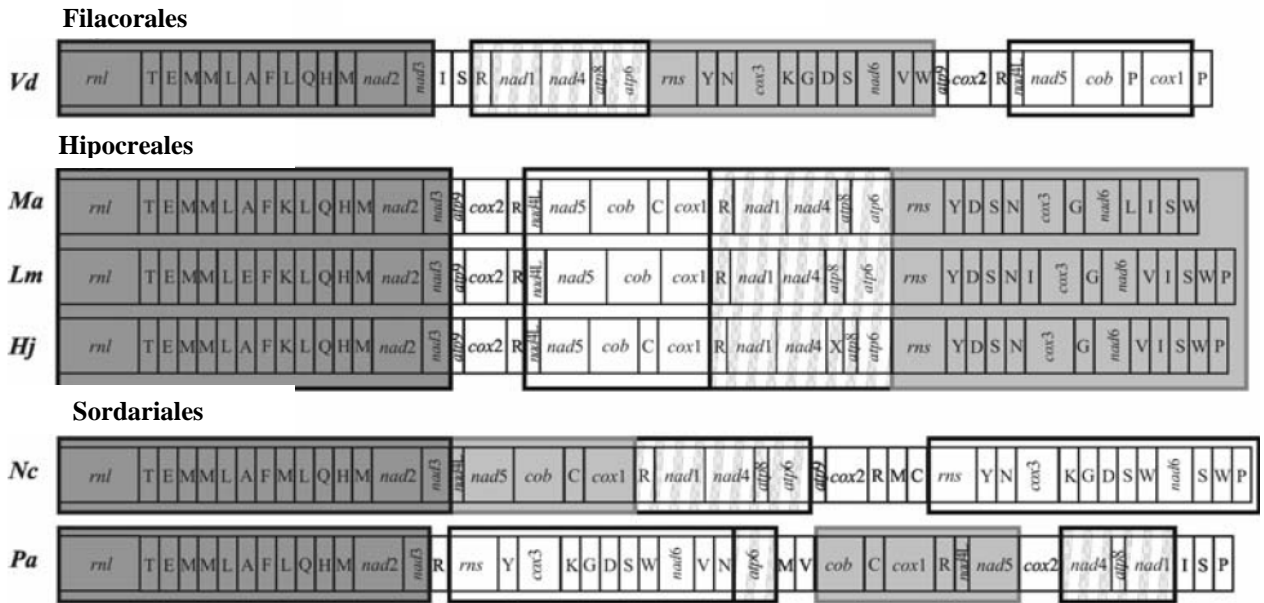


Figura 6. Comparação da ordem de genes de genomas mitocondriais completos de Sordariomicetos (Pantou et al. 2006). Organismos utilizados são representantes das ordens Filacorales: *V. dahliae* (Vd); Hipocreales: *H. jacorina* (Hj), *M. anisopliae* (Ma) e *L. muscarium* (Lm); e Sordariales: *N. crassa* (Nc) e *P. anserina* (Pa). As unidades de sentença são destacadas por caixas em negrito.

4.2.7. Análise filogenética

A relação filogenética entre *C. lindemuthianum* e outros diversos fungos foi estudada, utilizando-se seqüências de proteínas concatenadas obtidas neste trabalho e depositadas no GenBank. Árvores foram criadas pelo programa MEGA3.1, utilizando-se o método do Vizinho mais Próximo (VP) e Evolução Mínima (EM) e considerando as seqüências das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6 como uma única unidade protéica, com tamanho médio de 1000 aminoácidos.

Ambos os métodos geraram árvores filogenéticas com o mesmo padrão de ramificação e consistentes com a filogenia aceita para o grupo de fungos (Kouvelis et al., 2004; Pantou et al., 2006). Na base da ramificação da árvore estão todos os fungos Chitridiomycetos, seguindo-se os Basidiomycetos e, finalmente, os Ascomycetos analisados (Figura 7). Independente do método utilizado, estes grupos são reunidos no mesmo clado com altos valores de *bootstrap* (99-100%). Os Ascomycetos estão separados nos grupos Pezizomycotina e Sacharomycotina. Pantou et al. (2006) propõe a classificação de *V. dahliae* na ordem dos Filacorales a partir de

árvores filogenéticas, obtidas na análise de 14 proteínas mitocondriais concatenadas. A análise da seqüência de três proteínas concatenadas Cox1, Cox3 e Nad6 foi suficiente para a obtenção de resultados semelhantes.

A análise filogenética reuniu *C. lindemuthianum* com *V. dahliae*, constituindo um grupo muito próximo dos organismos Hipocreales. Outra característica que aproxima estes dois organismos, é a conservação na sintenia do bloco de genes *rns-trn_(YT)-cox3-trn_(KGDS)-nad6*, sendo o bloco de *trn*'s KGDS idêntico nessas duas espécies.

A filogenia molecular de fungos tem sido, muitas vezes, estudada com a utilização de seqüências de rDNA, tubulinas ou proteínas nucleares concatenadas. Algumas vezes os dados não são suficientes para elucidar e resolver as relações na filogenia de diferentes grupos de fungos. Cada vez mais, informações da seqüência de proteínas mitocondriais estão sendo disponibilizadas em bancos de dados públicos. O uso concatenado das mesmas tem possibilitado a obtenção de árvores filogenéticas robustas que clarificam relações filogenéticas muitas vezes incertas (Bullerwell et al., 2003) ou com valores de *bootstrap* baixos, quando rDNA ou genes RPB2 são utilizados (Kouvelis et al., 2004). O gênero *Colletotrichum* é constituído por diferentes espécies, cujo emprego de métodos morfológicos ou especificidade do hospedeiro nem sempre levam a uma diferenciação precisa da espécie. A utilização de métodos moleculares é uma excelente ferramenta para a caracterização das espécies do gênero *Colletotrichum* e, em muitos casos, para a determinação da variabilidade genética apresentada em populações de uma mesma espécie (Freeman et al., 1998). Os dados obtidos neste trabalho podem ser utilizados na busca de regiões capazes de diferenciarem, facilmente, as várias espécies do gênero *Colletotrichum*, ou até mesmo em nível de raças dentro de uma população, por meio da análise de polimorfismos de tamanho nas regiões intergênicas mitocondriais conforme sugerido em *V. dahliae* (Pantou et al., 2006).

A classificação do gênero *Colletotrichum* em nível de Ordem é controversa. Silva-Wanderlei et al. (2003), utilizando seqüências 18S rRNA, verificaram que o grupo de organismos do gênero *Glomerella* (teleomorfo de *Colletotrichum*) são, filogeneticamente, distantes da ordem Filacorales, sugerindo a colocação de *Glomerella* (e seu anamorfo *Colletotrichum*) na ordem Glomerelales. Em outros trabalhos, *Glomerella* (e seu anamorfo *Colletotrichum*) são agrupados na ordem Filacorales nas árvores filogenéticas obtidas na análise das seqüências da menor e, ou

maior subunidade dos genes rRNA (Jacobs et al., 2003; Goodwin, 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho, baseados na análise de três proteínas mitocondriais concatenadas e na ordem de genes mitocondriais, sugerem a ordem *Colletotrichum* como representante de fungos Filacorales.

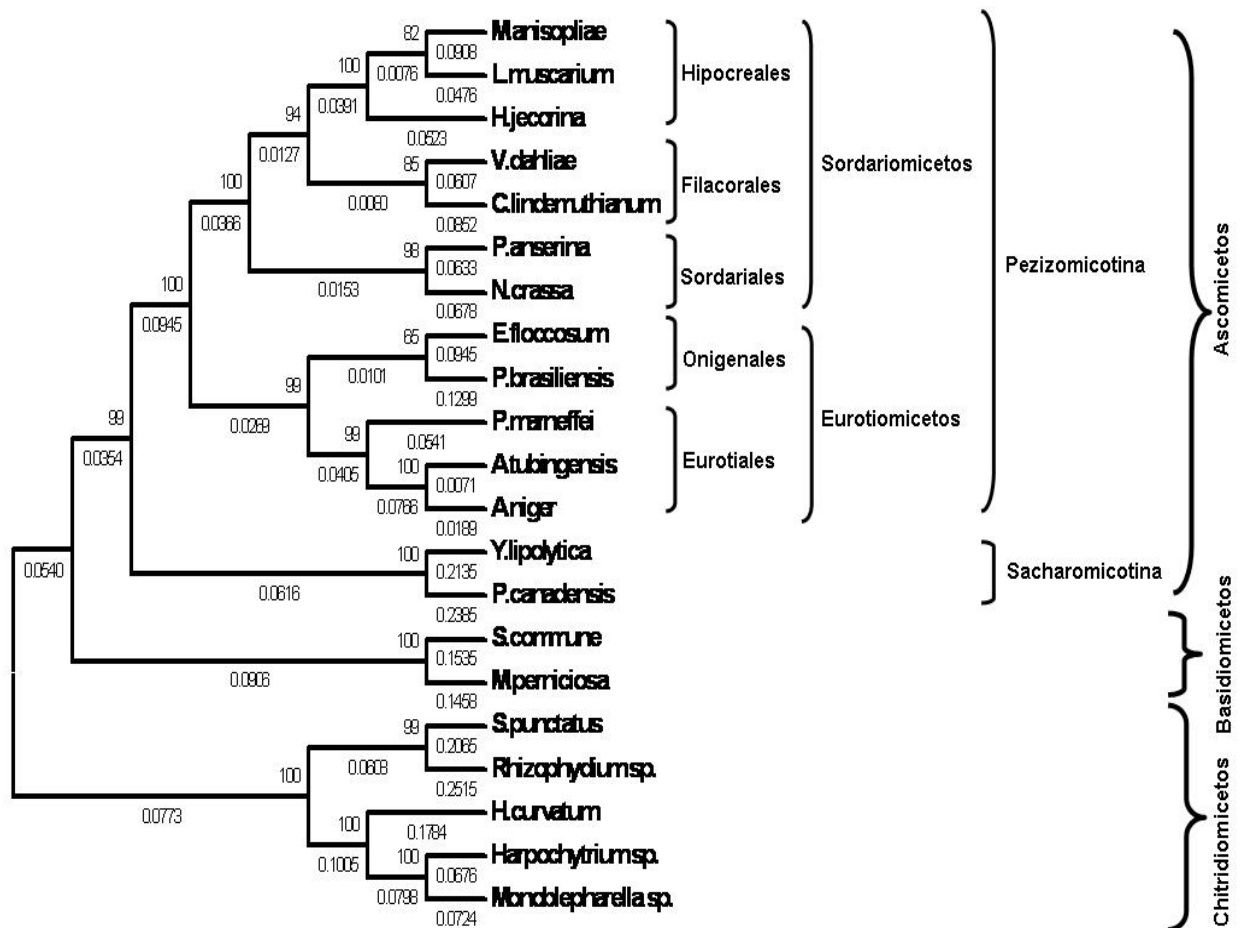


Figura 7. Relação filogenética de *C. lindemuthianum* com outros grupos de fungos. A árvore foi construída, utilizando-se o programa MEGA 3.1 pelo método do Vizinheiro mais Próximo com *bootstrap* de 5000 réplicas. As seqüências concatenadas das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6 foram utilizadas nas análises, como uma única unidade protéica. As seqüências foram obtidas do banco de dados GenBank, com os seguintes números de acesso: *V. dahliae* (NC_008248); *P. anserina* (NC_001329); *L. muscarium* (NC_004514); *P. marneffei* (NC_005256); *E. floccosum* (NC_007394); *M. anisopliae* (NC_008068); *A. tubingensis* (NC_007597); *H. jecorina* (NC_003388); *P. brasiliensis* (NC_007935); *A. niger* (NC_7445); *Y. lipolytica* (NC_002659); *P. canadensis* (NC_001762); *S. commune* (NC_003049); *M. perniciososa* (NC_005927); *S. punctatus* (NC_003060); *Rhizophytrium* sp. (NC_003053); *H. curvatum* (NC_003048); *Harpochytrium* sp. (NC_004760); *Monoblepharella* sp. (NC_004624) e *C. lindemuthianum* (seqüência não depositada). Seqüências de *N. crassa* foram obtidas no site <http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Downloads.html>. Os números acima e abaixo de cada nó indicam a porcentagem de vezes que cada ramo aparece, nas análises de *bootstrap* de 5000 replicatas e a distância genética, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

O genoma parcial da mitocôndria de *C. lindemuthianum* contém alto conteúdo de A+T, o que resulta na utilização de códons preferenciais neste genoma. Nele estão presentes genes codificadores para proteínas mitocondriais envolvidas com a geração de energia (*cox1*, *cox3* e *nad6*). Genes codificando para RNA ribossomal também foram identificados, além de outros 12 genes de tRNA's. O íntron do grupo I, detectado no genoma mitocondrial de *C. lindemuthianum*, é muito similar ao íntron i8 de *Podospora anserina* sendo que ambos interrompem o gene *cox1* na mesma posição e codificam uma endonuclease envolvida no processo de *Homing*;

Com a análise filogenética das sequências de aminoácidos concatenadas das proteínas Cox1, Cox3 e Nad6, foi possível separar diferentes fungos em grupos, cuja relação filogenética é aceita em outros trabalhos. A análise da sintenia dos genes mitocondriais também corroboram com a filogenia obtida neste trabalho. Sugere-se que *Colletotrichum* é próximo dos fungos pertencentes à ordem Filacorales,

As seqüências obtidas neste trabalho poderão ser utilizadas no estudo da variabilidade das diferentes espécies de *Colletotrichum*, além de auxiliar e otimizar os estudos de diversidade populacional de uma determinada espécie utilizando-se técnicas como PCR e, ou RFLP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3389-02.
- Ansari, K. I.; Palácios, 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) 635–42.
- Barr, C. M.; Neiman, M.; Taylor, D. R. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plant, fungi and animals. *New Phytologist* 168 (2005) 39-50.
- Benton W.D., Davis R.W.: Screening of lambda gt recombinant clones by hibridization to single plaques in situ. *Science* 196 (1977) 180-183.
- Berbee, M. L., Carmean, D. A.; Winka, K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the Ascomycota: how many nucleotides are enough? *Mol. Phylogenet.Evol.* 17 (2000) 337–44.
- Bullerwell, C. E. ; Forget, L.; Lang, B. F. Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Res* 31(2003):1614–23.
- Bullerwell CE, Leigh, J.; Forget L, Lang BF A comparison of three fission yeast mitochondrial. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 759-68.
- Cho, Y.; Qiu, Y. L.; Kuhlman, P.; Palmer, J. D. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 14244–49.
- Cho, Y.; Palmer, J. D. Multiple Acquisitions via horizontal transfer of a group I intron in the mitochondrial *cox1* gene during evolution of the Araceae family. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 1155- 65.
- Clarke, L.; Carbon, J. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome *Cell*, 9 (1976) 91–9.
- Cummings, D. J.; McNally, K. L.; Domenico, J. M.; Matsuura, E.T. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr Genet* 17 (1990) 375–402.
- 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.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A.L.; Bailey, J. A.; Langin, T. A GAL4-like Protein Is Involved in the Switch between Biotrophic and Necrotrophic

- Phases of the Infection Process of *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. *Plant Cell*, 12 (2000) 1579-90.
- Ellis, J. S.; Knight, M. E.; Goulson, D. Delineating species for conservation using mitochondrial sequence data: the taxonomic status of two problematic *Bombus* species (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation* 9 (2005) 75-83.
- Fabre, J. V., Julien, J., Parisot, D., and Dron, M.. Analysis of diverse isolates *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycol. Res.* 99 (1995) 429-35.
- Felipe, M.S.S., Azevedo, M.A, Vainstein, M.H, Scharank, A. : *Biologia Molecular de fungos filamentosos: construção de banco genômico e de cDNA. Manual Técnico.* In. Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz". (1992) p.99.
- Forget, L.; Ustinova, J.; Wang, Z.; Huss, A. R.; Lang, F. B. *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Mol Biol Evol* 19 (2002) 310–19.
- Fox, T. D. Natural variation in the genetic code. *Annu Ver Genet* 21 (1987) 67–91
- Freeman, S.; Katan, T.; Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 82 (1998) 596–605.
- Ghimire, S.R.; Hyde, K.D.; Hodgkiss, I.J.; Shaw, D.S.; Liew, E. C. Y. Variation in the *Phytophthora infestans* population in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms *Phytopathology* 93 (2003)236–43
- Goodwin, S. B. Minimum phylogenetic coverage: an additional criterion to guide the selection of microbial pathogens for initial genomic sequencing efforts. *Phytopatolology* 94 (2004) 800-04.
- Gray, M. W. Mass migration of a group I intron: Promiscuity on a grand scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 14003-5.
- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 (1999) 95-8.
- Hamer, J.E.; Farrall, L.; Orbach, M.J.; Valent, B.; Chumley, F.G. Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9981-85.
- Haugen, P; Simon, D. M.; Bhattacharya, D. The natural history of group I íntrons *TRENDS in Genetics* 21 (2005) 111-19.

- Haugen, P.; Wikmark, O.G.; Vader, A.; Coucheron, D. H.; Sjøttem, E.; Johansen, S. D. The recent transfer of a homing endonuclease gene. *Nucleic Acids Research* 33 (2005) 2734-41.
- Holbrook, S. R.; Cheong, C.; Tinoco, I.; Kim, S. H. Crystal structure of an RNA double helix incorporating a track of non-Watson-Crick base pair. *Nature* 353 (1991) 579-81.
- Jacobs, A.; Coetzee, M. P. A.; Wingfield, B.; Jacobs, K.; Wingfield, M. J. Phylogenetic relationships among *Phialocephala* species and other ascomycetes *Mycologia*, 95(2003), 637–45.
- James, T. Y.; Porter, D.; Leander, C. A.; Vilgalys, R.; Longcore, J. E. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Can. J. Bot.* 78 (2000) 336–50.
- Jensen, A. B.; Gargas, A.; Eilenberg, J.; Rosendahl, S. Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal Genet. Biol.* 24 (1998) 325–34.
- Jurica, M. S.; Stoddard, B. L. Homing endonucleases: structure, function, and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (1999) 1304-26.
- Keeling, P. J.; Luker, M. A.; Palmer, J. D. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17 (2000) 23–31.
- Kouvelis, V.N.; Ghikas, D. V.; Typas, M. A. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications. *Fungal Genet Biol* 41 (2004) 930–40
- Kubelik, A. R.; Kenell, J. C.; Akins, R. A.; Lambowitz, A. M. Identification of *Neurospora* mitochondrial promoters and analysis of synthesis of the mitochondrial small rRNA in wild-type and the promoter mutant [poky]. *J Biol Chem* 265 (1990) 4515–26.
- Kumar, S., Tamura, K.; Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5 (2004) 150-63.
- Kurokawa, S.; Bessho, Y.; Higashijima, K.; Shirouzo, M.; Yokoyama, S.; Watanabe, K. I.; Ohama, T. Adaptation of intronic homing endonuclease for successful horizontal transmission. *FEBS Journal* 272 (2005) 2487-96.
- Latunde-Dada, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2 (2001) 187-98.

- Liu, Y. J.; Whelen, S.; Hall, B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 1799–1808.
- O'Connell, R. J.; Bailey, J. A.; Richmond, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological plant pathology* 27(1998): 75-98.
- Pantou, M. P.; Kouvelis, V. N.; Typas, M. A. The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*: a novel gene order for *Verticillium* and a diagnostic tool for species identification. *Curr Genet* (2006) 125-136.
- Paquin, B. P.; Laforest, M.-J.; Forget, L.; Roewer, I.; Wang, Z.; Longcore, J.; Lang, B. F. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr Genet* 31 (1997) 380–95
- Pellier, A. L.; Laugé, R.; Veneault-Fourrey, C.; Langin, T.: CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology*, 48(2003) 639-55.
- Saccone, S.; Gissi, C.; Reyes, A.; Larizza, A.; Sbisà, E.; Pesole, G. Mitochondrial DNA in metazoa: degree of freedom in a frozen event. *Gene* 286 (2002) 3–12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S. and A.R., Coulson: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-7.
- Schäfer, B. RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Gene* 354 (2005) 80–5.
- Sicard, D., Michalakis, Y., Dron, M., and Neema, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87 (1997) 807-13.
- Silva-Wanderlei, D.; Neto, E. R.; Hanlin, R. H. Molecular systematics of the Phyllachorales (Ascomycota, Fungi) based on 18S ribosomal DNA sequences. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46 (2003) 315-22.
- Siriputthaiwan, P.; Jauneau, A.; Herbert, C.; Garcin, D.; Dumas, B. Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Cell Science* (2005) 323-29.

- Somavilla, L.L.; Prestes, A.M. Identificação de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 24 (1999) 416-21.
- Specht, C. A.; DiRusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem* 119 (1982) 158-63.
- Thao, M.L.; Baumann, L.; Baumann, P. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology*. 4 (2004) 1471-2148.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-80.
- Veneault-Fourrey, C.; Parisot, D.; Gourges, M.; Laugé, R.; Lebrun, M. H.; Langin, T. The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Genet Biol.* 42 (2005) 306-18.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications.* ed. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J., San Diego. Academic Press, 1990. 315 - 22.
- Woo, P. C. Y.; Zhen, H.; Cai, J. J.; Yu, J.; Lau, S. K. P.; Wang, J.; Teng, J. L. L.; Wong, S. S. Y.; Tse, R. H.; Chen, R.; Yang, H.; Liu, B.; Yuen, K.-Y. The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Lett.* 555 (2003) 469-77.