

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**RNAi em *Colletotrichum lindemuthianum*: caracterização das proteínas-chave
e desafios para a aplicação**

Rafael Oliveira Rosa
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

RAFAEL OLIVEIRA ROSA

RNAi em *Colletotrichum lindemuthianum*: caracterização das proteínas-chave e desafios para a aplicação

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

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Sergio H.
Brommonschenkel
Leandro Lopes da Silva

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R788r
2025
Rosa, Rafael Oliveira, 1994-
RNAi em *Colletotrichum lindemuthianum*: caracterização
das proteínas-chave e desafios para a aplicação / Rafael Oliveira
Rosa. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia Agrícola, 2025.

Referências bibliográficas: f. 55-60.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.329>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Feijão - Doenças e pragas. 2. Antracnose - Controle.
3. Fungicidas. 4. Pulverização e polvilhação na agricultura.
I. Queiroz, Marisa Viera de, 1964-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 635.65294

RAFAEL OLIVEIRA ROSA

RNAi em *Colletotrichum lindemuthianum*: caracterização das proteínas-chave e desafios para a aplicação

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

APROVADA: 5 de março de 2025.

Assentimento:

Rafael Oliveira Rosa
Autor

Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 27/05/2025 às 14:48:07 e pela orientadora em 27/05/2025 às 17:33:38. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **NQSQ.HWY1.HRZ3** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o suporte ao longo desses anos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, por todo apoio desde a graduação, pelo incentivo constante, pela dedicação em compartilhar seus conhecimentos e pela orientação ao longo desta trajetória.

Ao meu coorientador Leandro Lopes da Silva pela paciência, apoio e todo conhecimento que foi passado desde a graduação.

Ao meu coorientador Sérgio Hermínio Brommonschenkel pelo apoio.

À Patrícia Pereira Fontes, por toda ajuda e suporte, pelas discussões enriquecedoras e pela dedicação que sempre contribuíram para o meu desenvolvimento.

Ao professor Mateus Ferreira Santana pelas conversas, conhecimentos transmitidos, e todo apoio quando precisei.

Aos meus amigos de fora da academia por se fazerem presentes e toda a torcida.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos e agregados, pelas trocas, conversas e momentos de distração, em especial (em ordem alfabética): Aléxia, Fábulo, Felipe, Gabriel, Giarlã, Jéssica, Lorena, Lorenzo, Luciano, Maria Eduarda, Mariana, Matheus, Raíssa.

Ao Antônio Carlos, Célio, Paulo, Letícia, a secretária do DMB e a toda equipe do Bioagro por sempre ajudarem quando precisei.

A todos que me acompanharam até aqui e que de alguma forma me ajudaram nesse processo.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

ROSA, Rafael Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2025.
RNAi em *Colletotrichum lindemuthianum*: caracterização das proteínas-chave e desafios para a aplicação. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz.
Coorientadores: Sergio Herminio Brommonschenkel e Leandro Lopes da Silva.

O agente etiológico da antracnose, uma das principais doenças do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Devido à alta variabilidade genética do patógeno e as limitações das estratégias convencionais de controle, como o uso de cultivares resistentes e fungicidas, torna-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens eficientes e sustentáveis. Neste contexto, o RNA de interferência (RNAi) surge como uma alternativa promissora, permitindo o silenciamento de genes essenciais para a patogenicidade do fungo. Com isso, o presente estudo teve como objetivos: caracterizar os principais componentes da maquinaria de RNAi em *C. lindemuthianum*; avaliar a expressão dos genes-chave durante a interação com o feijão-comum; investigar a capacidade do fungo de captar dsRNAs exógenos; e silenciar genes-alvo quando aplicados por pulverização (SIGS). A análise do genoma de *C. lindemuthianum* permitiu identificar proteínas-chave da maquinaria de RNAi, incluindo duas Argonautas (AGO), duas Dicer-like (DCL) e três RNA polimerases dependentes de RNA (RdRPs). Dentre essas, CIAGO2, CIRdRP2 e CIRdRP3 foram descritas pela primeira vez na espécie. Todas as proteínas apresentaram domínios altamente conservados, e a análise filogenética indica que os genes que as codificam foram mantidos nos genomas, com maior proximidade entre espécies do mesmo complexo taxonômico do gênero *Colletotrichum*. A expressão dos genes AGO1, RdRP3 e DCL1 do fungo na interação com a planta variou ao longo do tempo e da linhagem avaliada. Foram obtidos 18 e 180 transformantes de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum*, respectivamente, expressando GFP. A produção de dsRNAs apresentou baixo rendimento em dois métodos testados (*in vivo* e *in vitro*), resultando em uma média de 12,2 µg de dsRNA sintetizado pelo kit comercial. Os ensaios de captação de dsRNA por microcultivo indicaram que *C. lindemuthianum* é capaz de perceber dsRNAs exógenos, com aumento no número e tamanho de vacúolos, porém os resultados foram inconclusivos quanto a absorção. A pulverização dos dsRNAs direcionados a *CISGE1* (regulador transcricional putativo) e *C/pacC* (regulador transcricional em resposta ao pH) a 4 ng.µL⁻¹ não foram capazes de controlar a antracnose no feijão-comum nas condições avaliadas. Dessa forma, foi possível caracterizar as proteínas envolvidas no mecanismo de RNAi e demonstrar que *C. lindemuthianum*

é

capaz de perceber dsRNAs exógenos, abrindo caminho para futuros testes de captação. Além disso, este estudo contribui para a compreensão dos desafios associados a padronização e o uso de dsRNA como estratégia de controle de fitopatógenos e inicia as investigações desse método para *C. lindemuthianum*.

Palavras-chave: RNAi; Antracnose; Feijão-comum; SIGS

ABSTRACT

ROSA, Rafael Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2025. **RNAi in *Colletotrichum lindemuthianum*: characterization of key proteins and challenges for application.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Sergio Herminio Brommonschenkel and Leandro Lopes da Silva.

The etiological agent of anthracnose, one of the main diseases affecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), is the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Due to the high genetic variability of the pathogen and the limitations of conventional control strategies, such as the use of resistant cultivars and fungicides, the development of new, efficient, and sustainable approaches is necessary. In this context, RNA interference (RNAi) emerges as a promising alternative, enabling the silencing of essential genes for fungal pathogenicity. Thus, the present study aimed to: characterize the main components of the RNAi machinery in *C. lindemuthianum*; evaluate the expression of key genes during its interaction with common bean; investigate the fungus's ability to uptake exogenous dsRNAs; and silence target genes through spray-induced gene silencing (SIGS). The genomic analysis of *C. lindemuthianum* identified key proteins of the RNAi machinery, including two Argonaute (AGO) proteins, two Dicer-like (DCL) proteins, and three RNA-dependent RNA polymerases (RdRPs). Among these, CIAGO2, CIRdRP2, and CIRdRP3 were described for the first time in this species. All proteins exhibited highly conserved domains, and phylogenetic analysis indicates that the genes encoding them have been retained in the genomes, showing greater phylogenetic proximity among species within the same taxonomic complex of the genus *Colletotrichum*. The expression of fungal genes AGO1, RdRP3, and DCL1 during plant interaction varied over time and among the evaluated lineages. A total of 18 and 180 transformants expressing GFP were obtained for *C. lindemuthianum* and *C. truncatum*, respectively. The dsRNA production yield was low using both tested methods (in vivo and in vitro), resulting in an average of 12.2 µg of dsRNA synthesized using the commercial kit. The dsRNA uptake assays in microcultures indicated that *C. lindemuthianum* can detect exogenous dsRNAs, showing an increase in the number and size of vacuoles. However, the results were inconclusive regarding dsRNA absorption. Spraying dsRNAs targeting *CISGE1* (putative transcriptional regulator) and *ClpacC* (pH-responsive transcriptional regulator) at 4 ng.µL⁻¹ failed to control anthracnose in common bean under the evaluated conditions. Thus, this study successfully characterized the proteins involved in the RNAi mechanism and demonstrated that *C. lindemuthianum* can perceive exogenous dsRNAs, paving the way for

future uptake assays. Additionally, it contributes to the understanding of the challenges associated with standardizing and using dsRNA as a strategy for phytopathogen control and initiates investigations into this method for *C. lindemuthianum*.

Keywords: RNAi; Anthracnose; Common bean; SIGS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Microrganismos e condições de cultivo	14
2.2. Caracterização das proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA	14
2.3. Análise da expressão dos genes de RNAi	18
2.4. Transformação fúngica com o plasmídeo pSM1	18
2.5. Sequências-alvo e construção dos plasmídeos para expressão de dsRNA	20
2.6. Produção dos dsRNAs	21
2.6.1. Produção <i>in vivo</i>	21
2.6.2. Síntese <i>in vitro</i>	21
2.7. Teste de captação de dsRNA <i>in vitro</i>	22
2.7.1. Microcultivo.....	22
2.7.2. Extração de RNA, curva padrão dos primers e análise de expressão relativa	22
2.8. Teste de inibição <i>in vivo</i>	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1. Caracterização dos genes e proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA.....	25
3.2. Análise da expressão dos genes-chave para maquinaria de interferência de RNA.....	37
3.3. Transformação de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>C. truncatum</i> com plasmídeo pSM1.....	40
3.4. Produção dos dsRNAs	41
3.5. Teste de captação de dsRNA em <i>C. lindemuthianum</i>	46
3.6. Padronização dos <i>primers</i> e análise da expressão gênica por qPCR..	48
3.7. Teste de inibição <i>in vivo</i>	51
4. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES	61

1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento de grande importância nas dietas ao redor do mundo, especialmente em nações em desenvolvimento (Morales, 2003). No Brasil, esta cultura é fundamental, sendo uma das mais cultivadas e consumidas, gerando contribuições econômicas, culturais e, principalmente, nutricionais significativas, essenciais para a segurança alimentar (Barbosa & Gonzaga, 2012). Contudo, os produtores enfrentam um grande desafio relacionado a sanidade vegetal, por uma doença conhecida como antracnose. Esta doença pode levar a perda total da produção agrícola quando ocorre em condições favoráveis (Jurado et al., 2022; Wendland et al., 2018).

O agente etiológico da antracnose é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, um importante fitopatógeno hemibiotrófico que afeta toda a parte aérea do feijão-comum. Os sintomas característicos desta doença incluem lesões deprimidas nas vagens, acompanhadas pela produção de esporos alaranjados. A doença compromete também a haste, hipocótilo e nervuras foliares, resultando em murcha e, eventualmente, na morte da planta, um comportamento semelhante ao observado em outros patógenos foliares (Padder et al., 2017).

Devido a elevada variabilidade genética dentro da espécie, já foram descritas mais de 200 raças globalmente (Côelho et al., 2020; Martiniano-Souza et al., 2017), com várias delas relatadas no Brasil (Rodriguez-Guerra et al., 2003). Essa alta variabilidade aliada as limitações dos métodos convencionais de controle da doença, como a resistência vegetal e o uso de fungicidas, reforça a necessidade de inovação, de modo mais preciso e sustentável. Nesse cenário, o RNA de interferência (RNAi) surge como uma ferramenta biotecnológica promissora, capaz de promover o silenciamento específico de genes essenciais do patógeno, oferecendo um potencial aliado no manejo eficiente da antracnose.

Os RNAi são pequenas moléculas de dsRNA que, por meio de um mecanismo evolutivamente conservado em organismos eucariotos, suprimem a expressão de genes por meio da degradação de mRNA de uma sequência específica por pareamento de bases, repressão da tradução ou da inibição transcricional (Matzke & Birchler, 2005; Tomari & Zamore, 2005). Essas pequenas moléculas de dsRNA também desempenham um papel essencial na regulação de diversas funções biológicas. Sua presença é uma parte fundamental da defesa do organismo contra

elementos deletérios, tais como transposons, vírus e transgenes (Buchon & Vaury, 2006). O RNAi representa apenas um componente dentro de um complexo mecanismo coletivamente reconhecido como silenciamento de RNA (Tomari & Zamore, 2005), primeiramente descrito por Napoli et al. (1990).

O mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional mediado por RNAi é desencadeado pela presença de dsRNA na célula eucariótica. Este dsRNA pode ser gerado a partir de um *hairpin* de RNA derivado da transcrição sense e antisense sobrepostas, ou de ssRNAs resultantes da atividade de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP/QDE-1) (Borges & Martienssen, 2015). Na célula, os dsRNAs são processados pela endorribonuclease (RNase III) Dicer ou Dicer-like (DCL), originando pequenos RNAs (sRNAs) de fita dupla com tamanhos compreendidos entre 21 a 27 nucleotídeos (nt) que guiarão ao mRNA alvo (Carmell & Hannon, 2004; Matzke & Birchler, 2005; Tomari & Zamore, 2005).

A classificação desses pequenos RNAs varia de acordo com a molécula precursora e sua função (Meister & Tuschl, 2004). Os pequenos dsRNAs são associados a proteína Argonauta (AGO/QDE-2), que exerce função catalítica e integra o complexo de proteínas denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). Posteriormente, uma helicase (QDE-3) é responsável por abrir as fitas do dsRNA, e uma exonuclease (QIP) dependente de AGO, reconhece e degrada a fita passageira, desencadeando, assim, a ativação de RISC (Li et al., 2010).

O complexo RISC, ao adotar sua forma ativa, direciona-se para a busca de mRNAs alvo que apresentem complementaridade total ou parcial com a sequência do ssRNA remanescente, conhecido como sRNA guia. A dinâmica desse processo está relacionada a natureza do transcrito-alvo e a proteína AGO envolvida. Em decorrência da interação homóloga, o desfecho pode envolver a clivagem e degradação, repressão da tradução ou até mesmo o recrutamento de cofatores adicionais, resultando no silenciamento gênico (Borges & Martienssen, 2015; Wang et al., 2016).

As proteínas que compõem a maquinaria de interferência estão presentes em números variáveis no genoma de fungos e, em alguns casos, podem até mesmo estarem ausentes, como observado no ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae* (Shabalina et al., 2008) e no basidiomiceto *Ustilago maydis* (Kämper et al., 2006). Essa variação ocorre apesar de o RNAi ser um mecanismo amplamente conservado em eucariotos.

Nogueira et al. (2018) relataram a presença das proteínas da maquinaria de RNAi em *C. lindemuthianum* e demonstraram, por meio de linhagens transformantes que expressavam dsRNAs direcionados a genes-alvo, que esse sistema é funcional e capaz de promover o silenciamento gênico. Em um estudo complementar, Magalhães (2022) caracterizou funcionalmente as proteínas CIDCL1 e CIDCL2. O genoma de *C. lindemuthianum*, com mais de 100 Mbp, está entre os maiores já sequenciados dentro do gênero *Colletotrichum*, destacando-se pelo seu alto conteúdo de elementos repetitivos (Silva et al., 2024). No entanto, apesar do sequenciamento, outras proteínas-chave da maquinaria de RNAi, como as AGOs e as RdRPs, ainda não foram caracterizadas e avaliadas quanto a sua expressão durante a interação com a planta.

O RNAi tem sido amplamente explorado na pesquisa científica para modular a expressão de genes importantes de pragas e patógenos agrícolas, visando um manejo mais sustentável. Nesse contexto, tanto o Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (HIGS) quanto as aplicações tópicas, como no Silenciamento Gênico Induzido por Pulverização de dsRNA (SIGS), têm sido investigados (Mezzetti et al., 2020; Nerva et al., 2020). No entanto, a adoção do HIGS enfrenta desafios relacionados a manipulação genética de variedades e a resistência pública a alimentos transgênicos (Bhagta et al., 2023). Já o SIGS, embora promissor, tem sua eficácia limitada pela capacidade dos fungos em absorver dsRNA externo (Qiao et al., 2021).

A investigação da capacidade dos fungos em absorver dsRNAs é fundamental para o desenvolvimento do método de controle de doenças em lavouras, especialmente no contexto do SIGS. Estudos realizados com *Botrytis cinerea* e *Fusarium graminearum* demonstraram que esses fungos são capazes de absorver dsRNAs exógenos, o que impulsionou as pesquisas de proteção vegetal por meio de pulverização de dsRNAs (Koch et al., 2016; Wang et al., 2016). Além disso, pesquisas indicam que a eficiência de absorção e silenciamento gênico pode variar de acordo com o tamanho dos dsRNAs (Höfle et al., 2020; Werner et al., 2020).

Em outro estudo, Qiao et al. (2021) observaram que diversos fungos apresentam a capacidade de absorção de dsRNAs, mas *Colletotrichum gloeosporioides*, não demonstrou essa habilidade, excluindo-o como um candidato viável para o SIGS. Por outro lado, Gu et al. (2019) evidenciaram a atividade antifúngica de amplo espectro de um dsRNA direcionado a β -tubulina de *Fusarium asiaticum*, que também foi eficaz contra *Colletotrichum truncatum*. Esse resultado

sugere que a capacidade de absorção de dsRNAs não está necessariamente relacionada ao gênero do fungo, mas sim a características específicas de cada espécie. Por conta disso, deve-se compreender as particularidades de cada fungo nesse quesito.

Dentre os potenciais genes-alvo de *C. lindemuthianum*, destacam-se os que codificam as proteínas reguladoras transcricionais *SGE1* (*Six Gene Expression 1*) e *PacC*, com função importante na interação patógeno-hospedeiro. O gene *SGE1* é ortólogo ao gene *WOR1* (*White-opaque regulator 1*), um regulador previamente identificado no fungo dimórfico *Candida albicans*. No contexto de *C. albicans*, o gene *WOR1* desempenha um papel importante na transição de células brancas para opacas, sendo este um processo fundamental para o acasalamento (Huang et al., 2006). Em fungos filamentosos o gene *SGE1* foi inicialmente descrito no fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, conforme relatado por Michielse et al. (2009), como importante regulador para genes efetores. Teixeira et al. (2018) demonstrou que mutantes para o gene *SGE1* de *C. lindemuthianum*, não eram capazes de causar doença, e posteriormente ao se complementar a mutação com o gene *SGE1* funcional o fenótipo selvagem era restaurado (Dados não publicados).

O gene *pacC* (conhecido como *RIM101* em *C. albicans*) codifica um regulador transcricional que responde as mudanças de pH no ambiente, tendo sido inicialmente descrito por Caddick et al. (1986) no fungo *Aspergillus niger*. A proteína PacC atua ativando ou reprimindo a expressão de grupos de genes conforme as variações do pH ambiental. Em fungos fitopatogênicos, esse regulador é particularmente relevante, uma vez que, durante a interação com o hospedeiro, o pH local é constantemente modificado pela produção de enzimas e metabólitos secundários. Diversos estudos funcionais evidenciam o papel essencial de PacC na virulência de fitopatógenos, incluindo *B. cinerea* (Rasclé et al., 2018), *Colletotrichum acutatum* (You & Chang, 2007) e, em especial, *C. lindemuthianum* (Soares et al., 2014).

Dado o papel relevante dos genes *SGE1* e *pacC* na regulação de processos essenciais para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*, incluindo a expressão de genes efetores e a adaptação em resposta ao pH, esses genes apresentam características interessantes de candidatos a genes-alvo para estratégias de controle baseadas em silenciamento gênico. No entanto, não há estudos até o momento que investiguem a capacidade de *C. lindemuthianum* de absorver dsRNA do meio extracelular, nem abordagens que explorem o uso de interferência de RNA como

estratégia de controle para o silenciamento de genes nesse patógeno. Frente a essa lacuna, este trabalho teve como principais objetivos caracterizar os genes e proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA em *C. lindemuthianum* e avaliar a expressão desses genes durante a interação com a planta hospedeira por meio de análises de transcriptomas. Adicionalmente, foi investigada a capacidade do fungo de captar dsRNAs exógenos aplicados por pulverização, utilizando os genes *CISGE1* e *ClpacC* como alvos para avaliar a eficácia do silenciamento gênico no controle da antracnose em feijão-comum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e condições de cultivo

Foram empregados os isolados A₂ 2-3 do fungo *C. lindemuthianum* da raça fisiológica 89, bem como uma linhagem transformante do mesmo isolado contendo um gene que codifica a proteína verde fluorescente (eGFP) (Cl GFP⁺). Além disso, foram utilizados os isolados Coll49 de *C. truncatum*, proveniente da região de Taporã, Mato Grosso, Brasil, e disponível na coleção do Laboratório de Genética e Genômica da Interação Planta-patógeno/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa e o isolado transformante de *C. truncatum* expressando eGFP (Ct GFP⁺). Todos os isolados mencionados estão depositados na coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa. Para a manutenção das linhagens selvagem e transformante, os fungos foram cultivados em meio BDA (batata 200 g.L⁻¹; dextrose 20 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹), enquanto o meio de cultivo YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) foi empregado para a esporulação. As placas foram incubadas de 22-25°C por sete dias. Para obtenção do micélio para a transformação foi utilizado o meio GPYEC (glicose 20 g.L⁻¹; peptona 5 g.L⁻¹; extrato de levedura 1,0 g.L⁻¹; caseína hidrolizada 1,0 g.L⁻¹) sob agitação a 180 rpm e 22-25°C por 60 h. Os transformantes foram selecionados em meio BDA acrescido de higromicina.

As linhagens de *Escherichia coli* DH5α (Bethesda Research Laboratories, 1986) e *E. coli* HT115 (DE3) (Timmons et al., 2001) foram utilizadas para manutenção, multiplicação dos plasmídeos e a última para a expressão de dsRNAs. O cultivo das linhagens de *E. coli* foi realizado em meio LB (triptona 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; cloreto de sódio 5 g.L⁻¹, pH 7,0) suplementado com antibióticos conforme marca de seleção do plasmídeo.

2.2. Caracterização das proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA

Sequências de aminoácidos dos principais componentes da maquinaria de interferência de RNA, incluindo Argonauta (CAE85552.1), Dicer-1 (Q7S8J7.1), Dicer-2 (Q7SCC1.4) e RNA Polimerase dependente de RNA (CAB42634.1) de *Neurospora*

crassa, foram utilizadas para buscas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) por meio da ferramenta tblastn, contra o genoma de *C. lindemuthianum* (GCA_001693025.3). As sequências obtidas foram analisadas no contexto do genoma de *C. lindemuthianum* para identificação de genes homólogos, seguida pela busca das sequências de aminoácidos correspondentes no proteoma predito.

As proteínas putativas da maquinaria de interferência de RNA de *C. lindemuthianum* foram modeladas utilizando o software Phyre2.2 (Powell et al., 2025), e a análise de alinhamento dos modelos foi realizada com o auxílio do PyMOL (Delano, 2004).

Posteriormente, as sequências das proteínas preditas de *C. lindemuthianum* foram utilizadas para buscas no banco de dados do NCBI, visando identificar sequências homólogas de proteínas utilizando a ferramenta Blastp (Tabela 1). As espécies para comparação foram selecionadas com base na disponibilidade de proteomas preditos e anotados no banco de dados, incluindo representantes de diferentes complexos de *Colletotrichum* sp. e de outras espécies de gêneros com relevância agrônoma. Em seguida, as proteínas foram comparadas quanto aos seus domínios, utilizando o software InterProScan (Paysan-Lafosse et al., 2023), e quanto ao ponto isoelétrico e peso molecular, calculados pela ferramenta ExPASy Compute pI/Mw (Gasteiger et al., 2005).

Para o alinhamento foi utilizado o software MEGA 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) utilizando a ferramenta Muscle. Para as construções das árvores filogenética foi utilizada o método de máximo verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Os modelos de substituição adotados para cada proteína foram: LG+F+I para AGO1, WAG+G+F para AGO2 e JTT+G para as RdRPs.

Tabela 1. Espécies analisadas na comparação dos domínios proteicos da maquinaria de interferência.

Espécie	Número de Acesso				
	AGO1	AGO2	RdRP1	RdRP2	RdRP3
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	XP_053043509.2	XP_053051633.2	XP_053052245.2	XP_065615345.1	XP_053047853.2
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	KXH42120.1	KXH44790.1	KXH52611.1	KXH36561.1	KXH64525.1
<i>Colletotrichum salicis</i>	KXH49990.1	KXH49990.1	KXH69425.1	KXH68014.1	KXH59573.1
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	KXH51872.1	KXH25802.1	KXH38542.1	KXH41159.1	KXH29916.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	XP_018164615.1	GJC96601.1	TIC91144.1	XP_018155353.1	XP_018157259.1
<i>Colletotrichum tanacetii</i>	KAJ0163778.1	KAJ0167680.1	KAJ0162788.1	KAJ0163617.1	KAJ0161708.1
<i>Colletotrichum fructicola</i>	XP_031881930.2	KAE9576112.1	XP_031880807.1	KAF4914740.1	XP_031892774.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	XP_045265226.1	EQB58432.1	XP_045266137.1	EQB58275.1	XP_045256427.1
<i>Colletotrichum graminicola</i>	WDK13439.1	WDK09013.1	XP_008098403.1	XP_008095152.1	XP_008090715.1
<i>Colletotrichum sublineola</i>	KAK1964721.1	KDN61505.1	KAK1961474.1	KDN62798.1	KDN64811.1
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	ALJ83742.1	*	ALJ83735.1	*	*
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	TDZ21786.1	TDZ25519.1	TDZ14873.1	TDZ22553.1	TDZ21116.1
<i>Colletotrichum sidae</i>	TEA12087.1	TEA21094.1	TEA17848.1	TEA22573.1	TEA20148.1
<i>Colletotrichum trifolii</i>	TDZ41219.1	TDZ58411.1	TDZ62036.1	TDZ47673.1	TDZ44814.1
<i>Colletotrichum spinosum</i>	TDZ36942.1	TDZ38534.1	TDZ30436.1	TDZ39669.1	TDZ34130.1
<i>Colletotrichum incanum</i>	KZL85986.1	KZL81875.1	KZL80643.1	KZL83216.1	OHX00707.1
<i>Colletotrichum tofieldiae</i>	KZL75681.1	GKT57731.1	KZL71898.1	GKT56229.1	GKT62364.1

<i>Colletotrichum chlorophyti</i>	OLN96063.1	OLN85246.1	OLN97828.1	OLN96648.1	OLN96648.1
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	XP_022481629.1	XP_022475177.1	XP_022468057.1	XP_022477158.1	XP_022480632.1
<i>Colletotrichum truncatum</i>	XP_036579536.1	XP_036586966.1	XP_036577310.1	XP_036576816.1	XP_036588921.1
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_003716704.1	ELQ40522.1	XP_003711624.1	KAH8847542.1	QBZ66012.1
<i>Botrytis cinerea</i>	XP_024547409.1	EMR90743.1	EMR88054.1	CCD46179.1	EMR89870.1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	APA14427.1	APA08025.1	XP_001595288.1	APA05487.1	XP_001586068.1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	KFG87426.1	KAK8919526.1	KJK77229.1	KFG77919.1	KAK8917356.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	KAF5260926.1	KAJ4066266.1	KAI7765291.1	KAJ4136986.1	KAK2697065.1
<i>Verticillium dahliae</i>	KAF3360877.1	RBQ77339.1	XP_009655407.1	KAF3349493.1	KAH6705528.1

*Sequências não depositadas.

2.3. Análise da expressão dos genes de RNAi

Para a análise comparativa da expressão gênica, foram utilizados dados de transcriptomas de diferentes raças de *C. lindemuthianum* e espécies de *Colletotrichum*. O transcriptoma de *C. lindemuthianum* raça 89 (Silva et al., 2024) foi analisado em condições de crescimento vegetativo em meio líquido GPYECH, bem como durante a interação com a planta, em 48 e 120 horas após a inoculação (hpi). Além disso, foram incluídos dados brutos do RNA-seq de três outras raças de *C. lindemuthianum*: raça 81 (Chang et al., 2024), analisada em 0 e 6 hpi; raça 38 (Jurado et al., 2022), analisada em 24 e 48 hpi; e raça 73 (Padder et al., 2016), com análises em 0, 24, 72 e 96 hpi. Também foram analisados dados de *Colletotrichum orbiculare* (PRJDB15139), em 24, 48 e 72 hpi, e de *C. truncatum* (Bouffleur et al., 2022), com análises em 0, 12, 48 e 120 hpi. No caso de *C. truncatum* foram gerados quatro perfis transcriptômicos, resultantes da combinação de dois isolados distintos do fungo (CMES1059 e CMES1080) com duas cultivares diferentes de soja (*Glycine max*) (IPRO7739 e IPRO8372).

A expressão gênica foi analisada conforme o protocolo descrito por Silva et al. (2022). Inicialmente, o genoma de *C. lindemuthianum* foi indexado utilizando o Bowtie2 v. 2.2.8 (Langmead et al., 2009) com parâmetros padrão. Posteriormente, as leituras das bibliotecas do transcriptoma foram alinhadas ao genoma de referência utilizando o Tophat v.2.1.1 (Trapnell et al., 2009). A montagem dos transcriptomas e a quantificação dos níveis de expressão gênica foram realizadas com o auxílio do Cufflinks v.2.2.1 (Trapnell et al., 2010). Para identificar diferenças na expressão gênica entre as condições avaliadas, foi empregado o Cuffdiff (Trapnell et al., 2013). Os níveis de expressão dos genes candidatos foram quantificados em FPKM (Fragmentos por Quilobase de Transcrição por Milhão de Leituras Mapeadas). Os dados foram utilizados para construção dos gráficos pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Inc.).

2.4. Transformação fúngica com o plasmídeo pSM1

No estudo conduzido pelo grupo de Gu et al. (2019) foi demonstrado que o fungo *C. truncatum* possui a capacidade de absorver dsRNA do ambiente externo.

Com base nisso, foram realizados ensaios utilizando *C. truncatum* como controle de captação de dsRNA.

Para isso, foi realizada a transformação de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* utilizando o plasmídeo pSM1 (Pöggeler et al., 2003), que carrega o gene *egfp*, que codifica a proteína verde fluorescente, e o gene que confere resistência a higromicina B (*hph*).

A transformação foi realizada por meio da utilização de protoplastos, Polietilenoglicol/CaCl₂ adaptando métodos já descritos (Rodriguez & Yoder, 1987; Redman & Rodriguez, 1994). Para obtenção dos protoplastos, o fungo foi inoculado em meio GPYEC e cultivado por 60 horas sob agitação a 180 rpm e temperatura de 22 °C para *C. lindemuthianum* e 25°C para *C. truncatum*. Após o crescimento, 0,8 g de micélio seco em papel toalha foram transferidos para erlenmeyers de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução de KCl (0,8 M em 100 mM de tampão fosfato, pH 5,8) e 15 mg.mL⁻¹ de Lysing Enzyme L1412 (SIGMA), e a suspensão foi incubada a 32 °C por 3 horas sob agitação de 80 rpm. Os protoplastos obtidos foram filtrados em gaze e lavados 3 vezes: duas vezes em solução ST (Sorbitol 1M, Tris-HCl 100 mM) e uma vez em solução STC (Sorbitol 1M, Tris-HCl 100 mM e CaCl₂ 50 mM), utilizando centrifugação a 3000 *g* por 10 minutos a 4°C para cada lavagem. Os protoplastos foram ressuspensos em STC para uma concentração final de 1,0 x 10⁷ protoplastos.mL⁻¹.

Para a transformação, 10 µg do plasmídeo pSM1 foi adicionado a 200 µL da suspensão de protoplastos juntamente com 50 µL de PEG (polietilenoglicol 6000) a 60% em solução STC. No tubo controle, o plasmídeo não foi adicionado. A mistura resultante foi mantida em gelo por 20 minutos, seguida da adição de 500 µL da mesma solução de PEG a 60%, e manutenção à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Posteriormente, a suspensão foi completada com STC até atingir o volume final de 1,5 mL seguida da distribuição em placas de Petri utilizando o método *pour plate* em 20 mL de meio BDA contendo 0,56 M de sacarose como estabilizador osmótico, e então as placas foram colocadas a 22 °C ou a 25°C. Após 48 horas, uma sobrecamada de 10 mL de meio BDA contendo higromicina foi adicionada para atingir uma concentração final de 70 µg.mL⁻¹ nas placas de *C. lindemuthianum*, e 250 µg.mL⁻¹ nas placas de *C. truncatum*, concentrações definidas por teste preliminar. As placas foram retornadas a BOD até que as colônias transformantes aparecessem.

2.5. Sequências-alvo e construção dos plasmídeos para expressão de dsRNA

Os genes *CISGE1* e *ClpacC* de *C. lindemuthianum* foram selecionados como alvos neste estudo com base em investigações anteriores realizadas por Teixeira et al. (2018) e Soares et al. (2014), respectivamente. Como controle, utilizou-se o gene *egfp*. Para cada um desses genes foram escolhidas três sequências da região codificadora.

Primers destinados às construções dos plasmídeos foram desenhados por meio do software Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). A sequência mínima promotora (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3') reconhecida pela RNA polimerase T7 foi adicionada em suas extremidades 5'. A lista de primers pode ser consultada no apêndice A.

As sequências-alvo dos genes *CISGE1*, *ClpacC* e *egfp* foram amplificadas por meio de PCR. O DNA total do fungo selvagem foi obtido pelo método descrito por Specht et al. (1982) a partir do fungo selvagem, e utilizado como molde para a amplificação das sequências *CISGE1* e *ClpacC*. O plasmídeo pSM1 foi utilizado para amplificar o alvo correspondente ao gene *egfp*. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Para as construções foi utilizado o vetor comercial pGEM® T Easy (Promega). As reações de ligação foram conduzidas com a enzima T4 DNA Ligase e as amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C, seguindo as instruções do fabricante. O produto resultante das reações de ligação foi utilizado na transformação de células ultra-competentes de *E. coli* DH5 α , utilizando a técnica de choque térmico, conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

As células transformadas foram plaqueadas por *spread plate* em placas de Petri contendo meio LB suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e incubadas a 37 °C por 16 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas 20 colônias recombinantes de cor branca e uma colônia azul (controle negativo) para cada construção realizada, que foram transferidas para uma nova placa contendo meio LB suplementado com ampicilina/IPTG/X-Gal.

Posteriormente, as colônias foram submetidas à técnica de extração de lise alcalina (Sambrook et al., 1989) e o DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A presença do inserto no plasmídeo nas colônias candidatas foi verificada por PCR e clivagens com enzimas de restrição, submetidas a

eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando como marcador o 1 kb DNA Ladder RTU (Kasvi). Após confirmação, os plasmídeos foram extraídos com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep (Promega).

2.6. Produção dos dsRNAs

2.6.1. Produção *in vivo*

Células da linhagem HT115 (DE3) de *E. coli* foram submetidas à transformação com os plasmídeos recombinantes. Para este propósito, foi induzida a competência celular, seguida pela transformação por meio do choque térmico, seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As colônias transformantes foram então selecionadas em meio LB sólido, suplementado com tetraciclina ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubadas a 37°C . A presença do plasmídeo foi confirmada por meio da técnica de extração por lise alcalina, e o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para análise subsequente.

Para induzir a expressão dos dsRNAs *in vivo*, as bactérias transformantes foram cultivadas em 75 mL de caldo LB, suplementado com tetraciclina ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sob agitação a 200 rpm a uma temperatura de 37°C até atingirem uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,4. Em seguida, foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,4 mM à suspensão, e então reincubada a 37°C , mantendo a mesma velocidade de agitação, por um período de 5 horas (Ahn et al., 2019). A extração dos dsRNAs foi realizada com TRIzol® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante e o produto final analisado em gel de agarose a 1,5%.

2.6.2. Síntese *in vitro*

Para síntese *in vitro* foi utilizado o kit MEGAscript RNAi (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Os dsRNAs purificados foram então analisados quanto a sua concentração e integridade por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e espectrometria a 260 e 280 nm utilizando um aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.7. Teste de captação de dsRNA *in vitro*

2.7.1. Microcultivo

Foi realizado microcultivo em lamínulas de vidro utilizando suspensões de conídios de linhagens transformantes de *C. lindemuthianum* GFP⁺ e *C. truncatum* GFP⁺. As suspensões foram preparadas a partir de colônias com 7 dias de crescimento para *C. lindemuthianum* e 5 dias para *C. truncatum*, sendo calibradas para uma concentração final de 10⁵ conídios. mL⁻¹.

Inicialmente, dsRNAs específicos para o gene *egfp* (401 pb) foram adicionados nas suspensões de conídios na concentração final de 20 ng. µL⁻¹ (Spada et al., 2024). Como controle negativo, utilizou-se a mesma suspensão sem a adição de dsRNAs. As misturas foram homogeneizadas e inoculadas ao redor de lamínulas de vidro sobrepostas em meio de cultura BDA. Após incubação, as lamínulas foram avaliadas em microscópio de fluorescência EVOS M5000 Imaging System (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

Em um segundo experimento, foi realizado um novo microcultivo utilizando *C. lindemuthianum* GFP⁺, tratado com dsRNAs específicos para o gene *egfp* de diferentes tamanhos (215, 401 e 643 pb), misturados as suspensões de conídios na concentração final de 20 ng. µL⁻¹. Como controles negativos, foram utilizados dsRNA-SGE1 de 400 pb (não relacionado ao gene *egfp*) e uma suspensão de conídios sem adição de dsRNAs. Após homogeneização, as misturas foram inoculadas ao redor de lamínulas de vidro sobrepostas em meio BDA. As lamínulas foram incubadas e avaliadas após 72 horas em microscópio confocal LSM 900 (Zeiss) para análise da fluorescência.

2.7.2. Extração de RNA, curva padrão dos primers e análise de expressão relativa

Inicialmente, suspensões de conídios de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* GFP⁺ foram preparadas em uma concentração de 10⁶ conídios.mL⁻¹ e inoculadas em meio líquido GPYECH. As culturas foram incubadas em shaker a 22°C para *C. lindemuthianum* e 25°C para *C. truncatum*, sob agitação de 180 rpm por 4 dias. Após o período de incubação, o micélio foi recuperado por filtração a vácuo, macerado em nitrogênio líquido e submetido a extração de RNA total utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

A qualidade e a quantidade do RNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para garantir a ausência de contaminação por DNA genômico, 2 µg de cada RNA foram tratados com DNase a 37°C por 1 hora. A eficiência da digestão foi confirmada por PCR, utilizando primers que anelam no gene *egfp* e DNA genômico dos isolados como controle positivo.

Em seguida, os RNAs tratados foram utilizados para a síntese de cDNA, empregando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A confirmação da síntese de cDNA foi realizada por PCR, utilizando o DNA genômico dos isolados como controle positivo.

Os cDNAs sintetizados foram utilizados para avaliar a eficiência dos *primers* para os genes endógenos de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* e do gene *egfp*. As sequências dos *primers* utilizados estão disponíveis no apêndice A. Os primers que obtiveram eficiência entre 90 e 110% foram utilizados no ensaio de expressão relativa.

Para o ensaio de expressão relativa, foi preparada uma suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* GFP⁺ em meio líquido GPYECH, ajustada para uma concentração final de 10⁶ conídios.mL⁻¹. Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 2 µg de dsRNA-*egfp* de cada um dos três diferentes tamanhos (215, 401 e 643 pb), completando-se o volume final para 100 µL com a suspensão de conídios previamente preparada. Para o controle não houve adição de dsRNAs. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. As amostras foram incubadas em shaker a 180 rpm e 22°C até 5 dias após a inoculação. Posteriormente o RNA total das amostras foram extraídos utilizando TRIzol® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, seguida do tratamento com DNase. Os cDNAs foram sintetizados conforme a mencionado anteriormente.

Para a reação de qPCR, foi utilizado o kit SYBR® Green PCR-Master Mix (PROMEGA), e as leituras foram realizadas no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD). Os ensaios foram feitos em triplicata e a análise foi realizada utilizando o método da curva padrão. Os valores de Ct obtidos foram substituídos nas equações de regressão linear específicas para cada gene.

2.8. Teste de inibição *in vivo*

Sementes de feijão-comum da cultivar Pérola foram desinfestadas, iniciando com uma imersão em álcool a 70% por 5 minutos, seguida por um banho em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por mais 5 minutos, e então lavadas três vezes com água destilada esterilizada. Após este processo, as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro esterilizado, mantidas a uma temperatura de 22 °C no escuro e irrigadas diariamente com água destilada esterilizada até que as raízes primárias se desenvolvessem. Em sequência, as sementes germinadas foram transferidas para vasos de 1 L contendo substrato MecPlant® e mantidas em casa de vegetação até o estágio V3. Posteriormente as folhas primárias foram cuidadosamente excisadas no pecíolo, com auxílio de um bisturi desinfestado em álcool 70%.

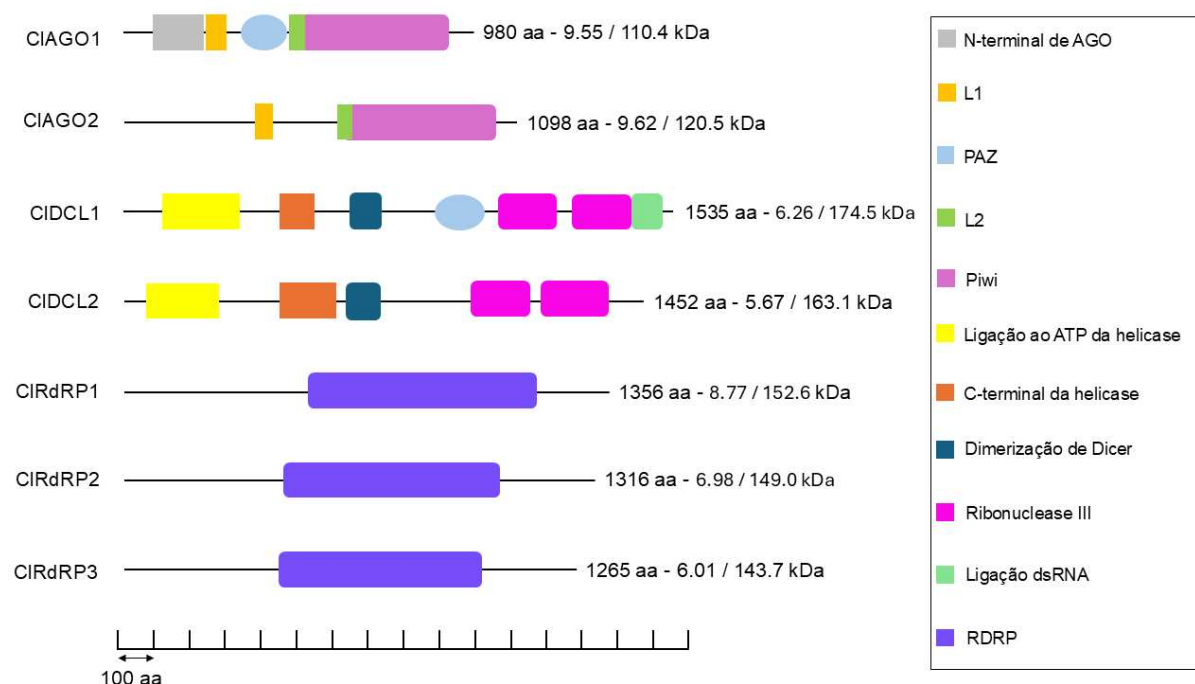
As folhas foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado, com um pedaço de algodão umedecido adicionado ao pecíolo na região do corte. Em seguida, as folhas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de conídios na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ e incubadas a 22°C por 12 horas no escuro em câmara BOD. Após a incubação inicial, as folhas foram pulverizadas com diferentes suspensões contendo dsRNA-*CISGE1* nos tamanhos de 259, 400 e 742 pb, dsRNA-*C/pacC* nos tamanhos de 210, 413 e 772 pb, ou uma mistura contendo todos os fragmentos de dsRNA-*CISGE1* e dsRNA-*C/pacC*, todas ajustadas para uma concentração final de 4 ng.µL⁻¹, em quintuplicata. Como controles, foram utilizadas folhas pulverizadas com água estéril e dsRNA-egfp de 401 pb. Após o tratamento, as folhas foram incubadas novamente a 22°C por mais 12 h no escuro e, posteriormente, mantidas em câmara BOD com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. A avaliação da severidade da doença foi realizada no sétimo dia após a inoculação (7 DAI), utilizando o software QUANT V.1.0.1 (Vale et al., 2002) para quantificação das lesões. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos genes e proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA

A busca por sequências homólogas de *N. crassa* no genoma de *C. lindemuthianum* resultou na identificação de proteínas putativas envolvidas no mecanismo de RNAi. Foram identificadas duas proteínas Argonautas (CIAGO1 e CIAGO2), três RNA polimerases dependentes de RNA (CIRdRP1, CIRdRP2 e CIRdRP3) e duas Dicer-like (CIDCL1 e CIDCL2) (Figura 1). Estudos anteriores, como o de Nogueira et al. (2019), haviam descrito apenas CIAGO1, CIRdRP1, CIDCL1 e CIDCL2, com base em análises realizadas nas sequências do primeiro genoma de *C. lindemuthianum*. Neste estudo, além da confirmação dessas proteínas, foram identificadas novas isoformas, incluindo CIAGO2 e duas RNA polimerases dependentes de RNA adicionais (CIRdRP2 e CIRdRP3), ampliando o conhecimento sobre os componentes do sistema de RNAi nessa espécie.

Figura 1. Representação esquemática dos domínios característicos das proteínas putativas da maquinaria de RNAi identificadas em *C. lindemuthianum*. Para cada proteína, são indicados o número de aminoácidos (aa), o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (kDa).



A identificação dessas proteínas está de acordo com descrições da literatura para fungos do filo *Ascomycota* e subfilo *Pezizomycotina* (Choi et al., 2014). Além disso, padrões semelhantes foram relatados em outras espécies do gênero *Colletotrichum*, como *C. higginsianum* e *C. graminicola*, que também apresentam duas proteínas Argonautas, duas Dicer-like e três RdRPs (Campo; Gilbert & Carrington, 2016).

Com base na sequência de aminoácidos identificada no proteoma predito de *C. lindemuthianum*, foram encontradas proteínas homólogas em diversas outras espécies. Dentre essas proteínas, algumas foram selecionadas para análise comparativa de domínios conservados, ponto isoelétrico e peso molecular putativo (Tabela 1). Especificamente, as proteínas CIAGO1, CIAGO2, CIRdRP1, CIRdRP2 e CIRdRP3 foram analisadas. Já as enzimas CIDCL1 e CIDCL2 foram caracterizadas e analisadas funcionalmente em um estudo anterior de Magalhães et al. (2022).

A análise comparativa dos domínios da proteína AGO1 em diferentes espécies de fungos, incluindo a CIAGO1 de *C. lindemuthianum* (Figura 2A), revelou que todas as espécies analisadas possuem os domínios característicos da proteína (domínio N-terminal, região L1 e L2, domínio PAZ e Piwi), evidenciando uma alta conservação evolutiva tanto entre espécies de *Colletotrichum* quanto em outros fungos. Essa conservação indica uma importância funcional desses domínios para a atividade da proteína AGO1, possivelmente relacionada ao seu papel na via de interferência de RNA.

Em relação as propriedades bioquímicas, observou-se uma baixa variabilidade no ponto isoelétrico (pI) predito das proteínas AGO1, com valores variando entre 9.42 (*C. higginsianum* e *Colletotrichum tanacetii*, ambos do complexo Destructivum) e 9.77 (*Fusarium oxysporum*). O pI corresponde ao pH no qual a carga líquida da proteína é igual a zero, e a faixa observada indica que as proteínas AGO1 são altamente básicas. Essa característica pode indicar possível interação eletrostática com moléculas carregadas negativamente, como dsRNAs, o que é consistente com o papel conhecido de proteínas Argonautas (Yan et al., 2003; Yang et al., 2024).

Quanto ao peso molecular, os valores variaram de 109,2 kDa (*Colletotrichum fioriniae* e *Colletotrichum nymphaeae*, ambas do complexo Acuntatum) a 114,4 kDa (*Sclerotinia sclerotiorum*). A proteína CIAGO1 apresentou um ponto isoelétrico de 9,55 e um peso molecular de 110,4 kDa, valores consistentes com os observados nas outras espécies analisadas.

A análise das proteínas AGO2 (Figura 2B), com destaque na CIAGO2 de *C. lindemuthianum*, revelou a presença do domínio Piwi conservado e da região L1 em todas as proteínas avaliadas. No entanto, o domínio N-terminal e a região L2 não foram identificados em todas as espécies. Em relação ao domínio PAZ, verificou-se que, entre as espécies de *Colletotrichum* estudadas, apenas *Colletotrichum salicis* apresentou esse domínio de forma característica e encontrada pelo banco de dados do InterProScan. Já entre as espécies pertencentes a outros gêneros, *Verticillium dahliae* foi a única que não apresentou esse domínio.

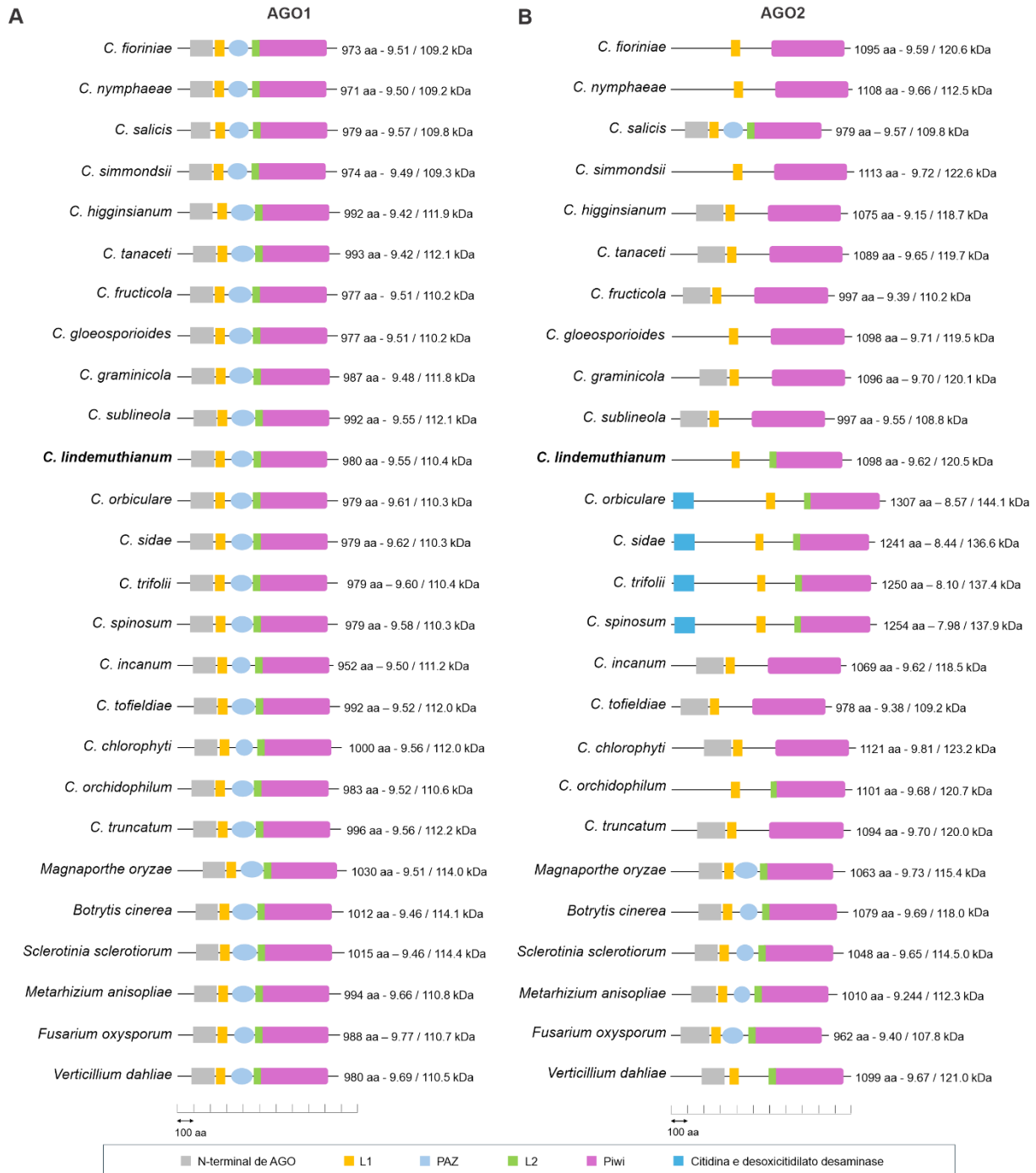
Diferentemente das demais proteínas, observou-se que as espécies do complexo Orbiculare avaliadas, com exceção de *C. lindemuthianum*, apresentam um domínio de citidina e desoxicitidilato desaminase. Especificamente, esse domínio foi identificado em *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum sidae*, *Colletotrichum trifolii* e *Colletotrichum spinosum*.

O domínio de citidina e desoxicitidilato desaminase não é característico das proteínas Argonautas em eucariotos ou procariotos (Yang et al., 2020). Sua presença em espécies mais recentes do complexo Orbiculare, mas ausente na linhagem ancestral representada por *C. lindemuthianum* (Damm et al., 2013), indica uma aquisição evolutiva desse domínio ao longo da diversificação do grupo.

Quanto ao domínio PAZ, embora o banco de dados InterProScan não tenha detectado sua presença na maioria das espécies de *Colletotrichum*, outros estudos apontam sua existência. Por exemplo, Campo, Gilbert & Carrington (2016) descrevem esse domínio em ChAGO2 de *C. higginsianum*. Podendo indicar limitações nas ferramentas de predição ou variações nas sequências proteicas que dificultam a detecção. Dessa forma, a funcionalidade de AGO2 não deve ser definida exclusivamente com base na predição de domínios proteicos, mas complementada por trabalhos experimentais.

Para comparar a estrutura geral das proteínas CIAGO1 e CIAGO2, bem como as regiões onde o domínio PAZ é normalmente encontrado em proteínas Argonautas, foi realizada modelagem molecular utilizando Phyre2.2 e PyMOL para visualização, modificações e alinhamento estrutural (Figura 3A-D). Adicionalmente, o alinhamento de sequências foi conduzido com as ferramentas Clustal W e BLAST (Apêndice B).

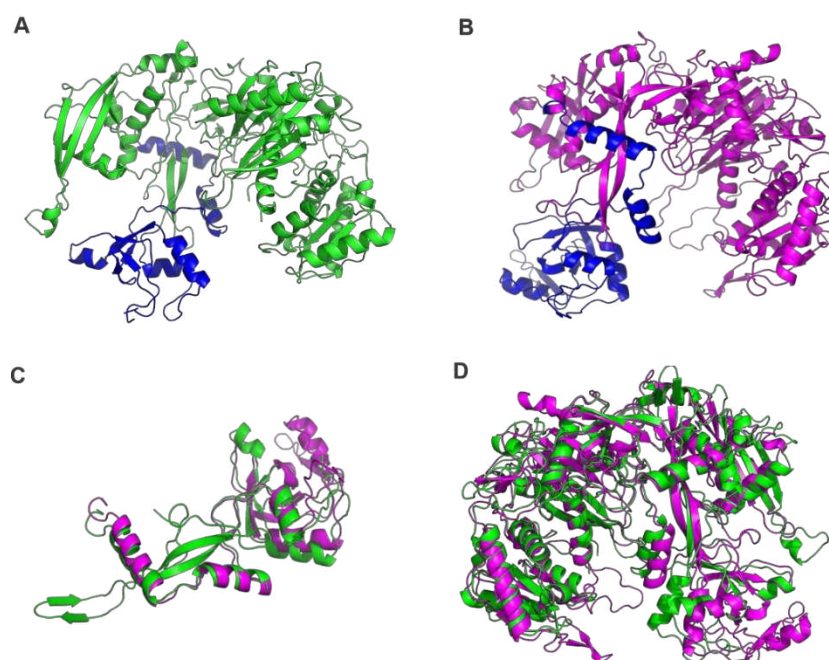
Figura 2. Representação esquemática dos domínios de AGO1 e AGO2 em diferentes espécies de fungos filamentosos. **A.** Proteínas AGO1; **B.** Proteínas AGO2. Para cada proteína, são indicados o número de aminoácidos (aa), o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (kDa).



O alinhamento revelou 29% de identidade e 46% de resíduos positivos, com um E-value de $7e^{-64}$. Isso indica que apesar da identidade relativamente baixa, as proteínas compartilham regiões conservadas, sugerindo funções similares. Na análise estrutural, as regiões correspondentes ao domínio PAZ, localizadas entre os motivos L1 e L2, foram alinhadas (Figura 3C), resultando em um RMSD de 1,207 Å para essa região específica. Esse baixo valor indica alta similaridade estrutural (Bordogna et al., 2011), evidenciando a conservação funcional desta região. Valores de RMSD próximos de zero indicam maior similaridade estrutural, sendo zero equivalente a estruturas idênticas. Esse resultado corrobora com o que foi descrito para ChAGO2 de *C. higginsianum*, que apresenta o domínio PAZ (Campo et al., 2016), apesar de não ter sido observado no presente estudo pelo software InterProScan (Figura 2B).

Assim, os resultados obtidos apontam que, embora CIAGO1 e CIAGO2 apresentem diferenças estruturais, a região do domínio PAZ é altamente conservada, podendo apresentar um papel funcional, possivelmente relacionado a ligação de pequenos RNAs, conforme descrito na literatura (Yang et al., 2020; Gu et al., 2012). No entanto, estudos indicam que proteínas Argonautas podem manter alguma funcionalidade mesmo na ausência desse domínio, tendo parte da sua eficiência reduzida (Gu et al., 2012).

Figura 3. Representação estrutural de CIAGO1 e CIAGO2 e análise comparativa de seus domínios. **A.** Estrutura de CIAGO1, representada em verde, com destaque em azul para a localização do domínio PAZ. **B.** Estrutura de CIAGO2, representada em rosa, indicando a região onde o domínio PAZ é normalmente encontrado, destacado em azul. **C.** Alinhamento das regiões entre os sítios L1 e L2, que abrangem a posição do domínio PAZ. A região correspondente a CIAGO1 é destacada em verde, enquanto a região equivalente de CIAGO2 é mostrada em rosa. **D.** Alinhamento estrutural global entre CIAGO1 e CIAGO2, evidenciando as similaridades e diferenças conformacionais entre as duas proteínas.



Por outro lado, as diferenças estruturais podem refletir em adaptações da proteína ao longo do tempo. Essas variações podem estar associadas, por exemplo, ao tamanho das proteínas AGO2, que dentre as avaliadas variou de 962 aa em *F. oxysporum* a 1307 aa em *C. orbiculare*. Além disso, proteínas que apresentam o domínio adicional de citidina e desoxicitidilato desaminase mostraram valores de pI menores (7,98 em *C. spinosum* – 8,57 em *C. orbiculare*) em comparação com aquelas que não o possuem (9,15 em *C. higginsianum* a 9,81 em *C. chlorophyti*). Esse pI está próximo ao encontrado nas proteínas AGO1 relatadas anteriormente, conferindo o caráter básico.

As proteínas RdRPs possuem um único domínio funcional, denominado domínio RdRP (Zong et al., 2009), o qual foi identificado nas três RdRPs de *C. lindemuthianum* analisadas neste trabalho (Figura 1). A Figura 4 ilustra a representação esquemática dos domínios das RdRPs, destacando a conservação dessas proteínas.

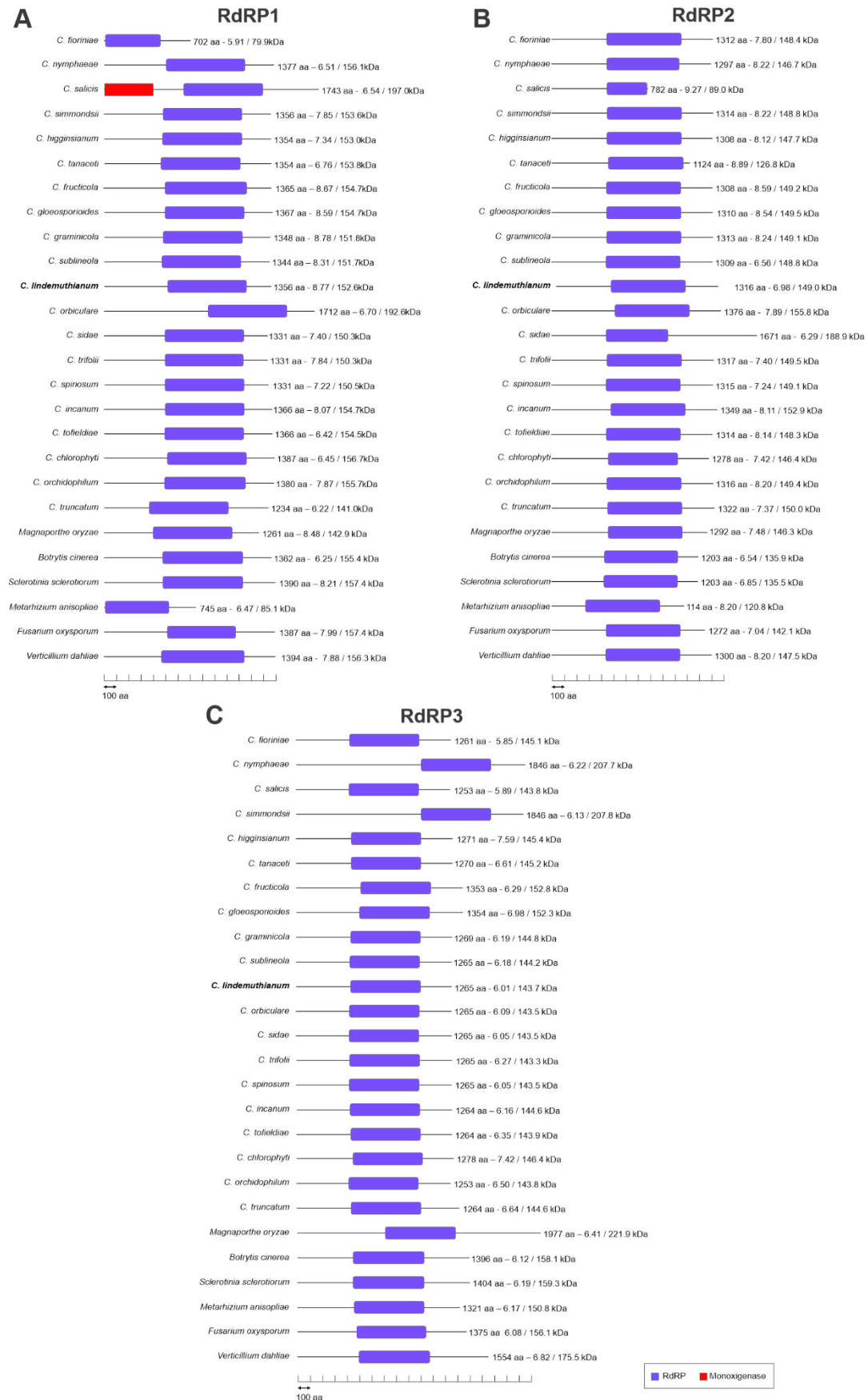
Todas as RdRPs analisadas apresentaram o domínio RdRP conservado, essencial para a atividade dessas proteínas. No entanto, a RdRP1 de *C. salicis* exibe um domínio adicional de monoxigenase, o qual não é característico dessa família e, até o momento, não foi reportado na literatura para outras RdRPs.

O tamanho das proteínas RdRP1 variou significativamente entre as espécies analisadas, de 702 resíduos de aminoácidos (aa) em *C. fiorinae* a 1743 aa em *C. salicis*, ambas pertencentes ao complexo Acutatum. A grande diferença observada em *C. salicis* pode estar relacionada à presença do domínio de monoxigenase, que adiciona uma extensão considerável a estrutura proteica. No entanto, variações expressivas no tamanho da RdRP1 também foram detectadas dentro do mesmo complexo. Por exemplo, *C. orbiculare* apresenta uma CoRdRP1 com 1712 aa, um tamanho próximo ao de *C. salicis*, porém sem o domínio de monoxigenase. Em contraste, outras espécies do complexo Orbiculare, como *C. lindemuthianum* (CIRdRP1, 1356 aa), *C. sidae* (CsRdRP1, 1331 aa), *C. trifolii* (CtrRdRP1, 1331 aa) e *C. spinosum* (CspRdRP1, 1331 aa), apresentam proteínas menores e mais uniformes em tamanho.

De forma geral, o tamanho das proteínas RdRP3 variou de 1253 aa (143,8 kDa) em *C. salicis* a 1977 aa (221,9 kDa) em *Magnaporthe oryzae*. O pl também apresentou ampla variação, indo de 5,85 em *C. fiorinae* a 7,59 em *C. higginsianum*.

Apesar das diferenças entre as RdRPs, todas compartilham um domínio conservado comum, o que evidencia sua importância. Além disso, o número de cópias dos genes que codificam RdRPs em eucariotos é variável (Choi et al., 2014). No entanto, ao longo da evolução, esses genes, mesmo em mais cópias, foram mantidos, sugerindo que desempenham funções essenciais. As variações observadas nas proteínas podem refletir diferenças funcionais, possivelmente associadas a adaptações específicas em linhagens evolutivas (Zong et al., 2009).

Figura 4. Representação das proteínas RdRPs de diferentes espécies de fungos filamentosos. **A.** Proteínas RdRP1; **B.** Proteínas RdRP2; **C.** Proteínas RdRP3. Para cada proteína, são indicados o número de aminoácidos (aa), o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (kDa).

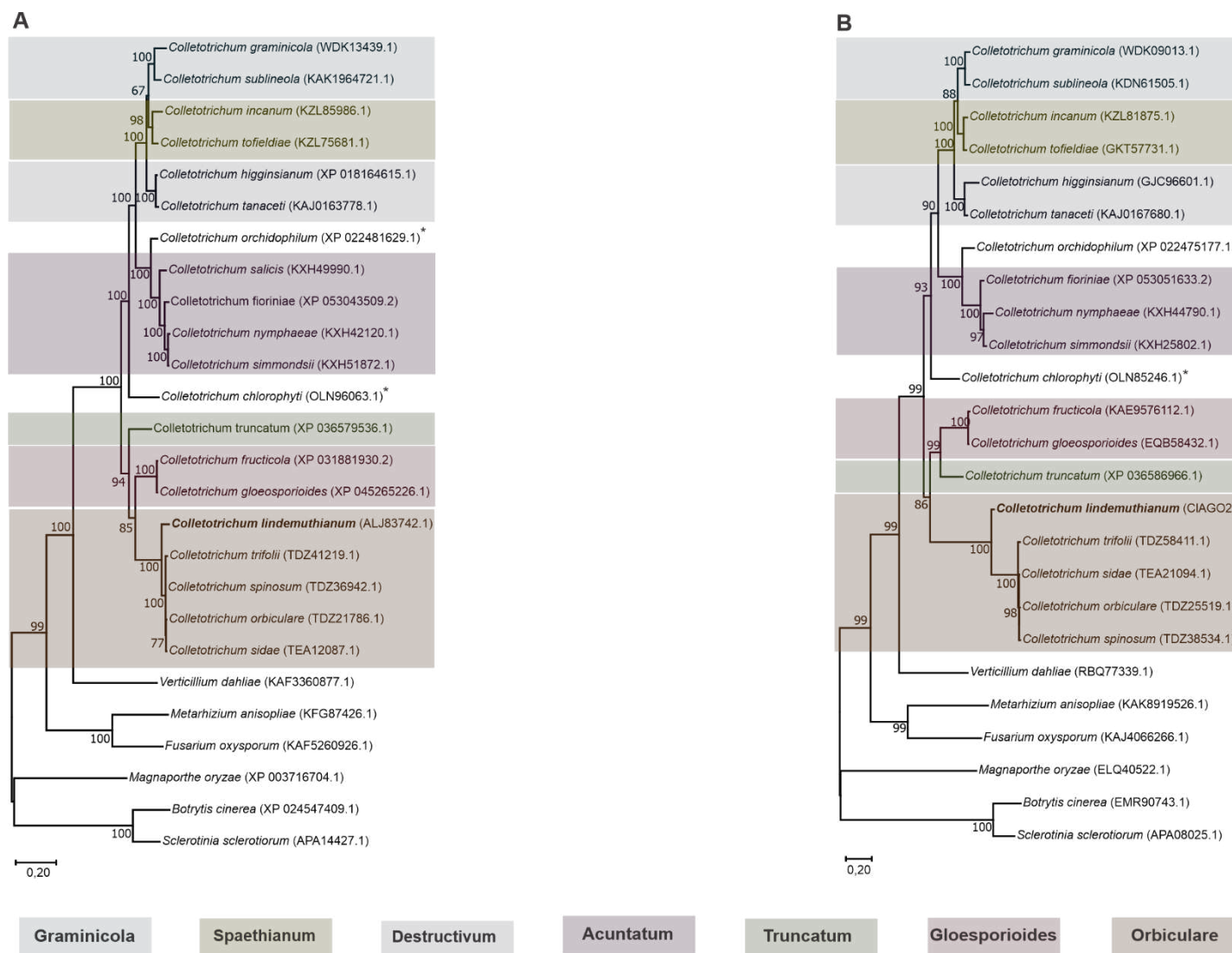


A Figura 5 apresenta as filogenias das proteínas AGO1 (Figura 5A) e AGO2 (Figura 5B) de diferentes espécies de fungos.

As espécies agruparam-se de acordo com seus respectivos complexos, evidenciando a conservação evolutiva. O complexo Orbiculare forma um clado bem definido e com alto suporte em ambas as árvores, indicando uma relação evolutiva próxima entre suas espécies. O complexo Acuntatum também se distingue dos demais, com altos valores de *bootstrap*. Os complexos Gloeosporioides e Truncatum aparecem próximos, sugerindo maior proximidade filogenética, enquanto Graminicola, Spaethianum e Destructivum agrupam-se separadamente, destacando sua divergência em relação aos demais.

A comparação entre as árvores de AGO1 e AGO2 mostra uma topologia semelhante, indicando que a divergência dessas proteínas acompanhou a separação dos complexos de *Colletotrichum*. Pequenas variações na topologia e nos valores de *bootstrap* podem refletir diferenças na conservação das proteínas entre os grupos. A maioria dos ramos apresenta valores de *bootstrap* elevados, especialmente dentro dos complexos. No entanto, alguns nós apresentaram suporte menor, possivelmente devido a regiões mais variáveis nas sequências de aminoácidos.

Figura 5. Filogenia das proteínas Argonautas em fungos filamentosos. **A.** AGO1; **B.** AGO2. O “*” representa as espécies de *Colletotrichum* sem complexo descrito.

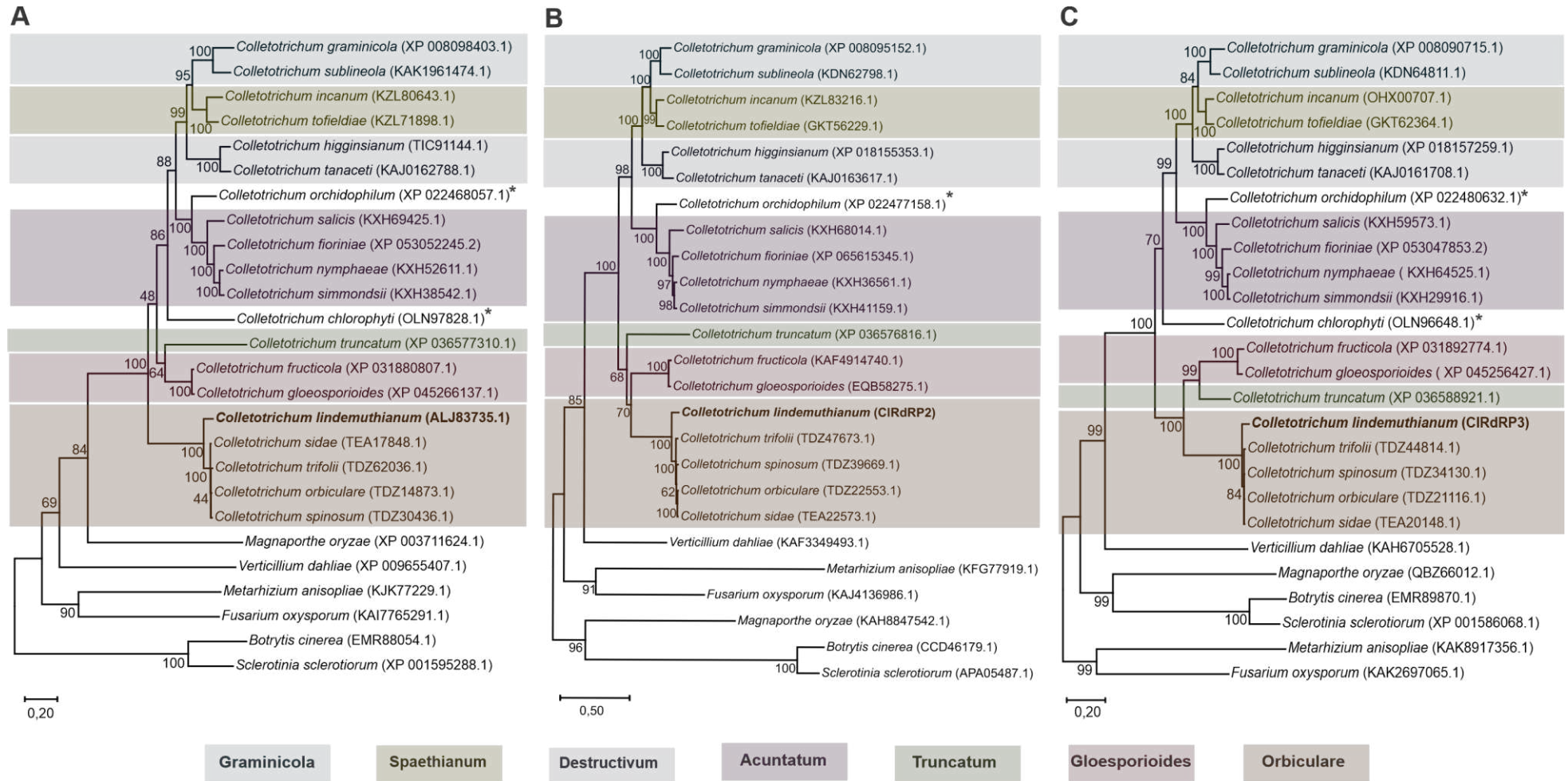


Essas observações indicam que a diferenciação das proteínas Argonautas acompanhou a evolução do gênero *Colletotrichum*, provavelmente em decorrência de adaptações funcionais específicas (Dang et al., 2011). Um exemplo é a divergência funcional observada em *N. crassa*, onde os genes parálogos QDE-2 e SMS-2 (ambos codificam proteínas Argonautas) desempenham papéis distintos: QDE-2 atua principalmente no estágio vegetativo, enquanto SMS-2 está envolvida no estágio sexual (Cogoni & Macino, 1997; Lee et al., 2003). Em contraste, no fitopatógeno *Fusarium graminearum*, as proteínas Argonautas são expressas durante a infecção viral, atuando conjuntamente na defesa antiviral (Yu et al., 2018).

As árvores filogenéticas das proteínas RdRP1, RdRP2 e RdRP3 (Figura 6A-C) mostram uma forte conservação dentro dos complexos taxonômicos de *Colletotrichum*, de forma semelhante ao observado para as proteínas AGO. Assim como nas três filogenias de RdRPs, as espécies agruparam-se de acordo com seus respectivos complexos. Pequenas diferenças nas árvores podem estar associadas a processos de especialização funcional e adaptação a diferentes hospedeiros.

Para as espécies de *Colletotrichum* analisadas, a topologia das árvores indica grande conservação das proteínas relacionadas ao mecanismo de RNAi dentro de cada grupo, sugerindo que houve uma pressão seletiva para a manutenção dessas proteínas, apontando um papel essencial no ciclo de vida dos fungos. Os altos valores de suporte estatístico reforçam a ideia de que a evolução dessas proteínas está associada a diversificação dos complexos taxonômicos do gênero.

Figura 6. Filogenia das RNA polimerases dependentes de RNA (RdRP) em fungos filamentosos. **A.** RdRP1; **B.** RdRP2; **C.** RdRP3. O “*” representa as espécies de *Colletotrichum* sem complexo descrito.



3.2. Análise da expressão dos genes-chave para maquinaria de interferência de RNA

A análise da expressão dos principais genes envolvidos no mecanismo de interferência de RNA foi realizada com base em transcriptomas disponíveis no banco de dados do NCBI, provenientes da interação entre diferentes espécies e linhagens de *Colletotrichum* e suas respectivas plantas hospedeiras. A Figura 7 apresenta um *heatmap* que ilustra os perfis de expressão gênica nessas interações.

As figuras 7A-D mostram a expressão dos genes em *C. lindemuthianum*, representado por isolados pertencentes às raças 89, 38, 81 e 73, durante a interação com o feijão-comum. O Apêndice C (A-D) apresenta o perfil de expressão de duas linhagens de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1080) interagindo com as cultivares de soja IPRO7739 e IPRO8372. Por fim, o Apêndice C (E) representa a expressão em *C. orbiculare* na interação com plantas de pepino.

O ciclo de infecção nas espécies analisadas segue um padrão temporal característico, conforme descrito na literatura. Em *C. lindemuthianum* e *C. orbiculare*, a fase apressorial se estabelece por volta de 24 hpi. A fase biotrófica ocorre entre 48 e 72 hpi em *C. lindemuthianum* e entre 72 e 96 hpi em *C. orbiculare*. A transição para a fase necrotrófica geralmente ocorre a partir de 96 hpi em *C. lindemuthianum* e 120 hpi em *C. orbiculare*, embora variações possam ser observadas entre diferentes linhagens e condições experimentais (Gan et al., 2013; Irieda et al., 2014; Silva et al., 2021). Para *C. truncatum*, a formação do apressório é observada já em 6 hpi, com a fase biotrófica ocorrendo em 48 hpi e a transição para a necrotrófica a partir de 72 hpi (Bouffleur et al., 2022).

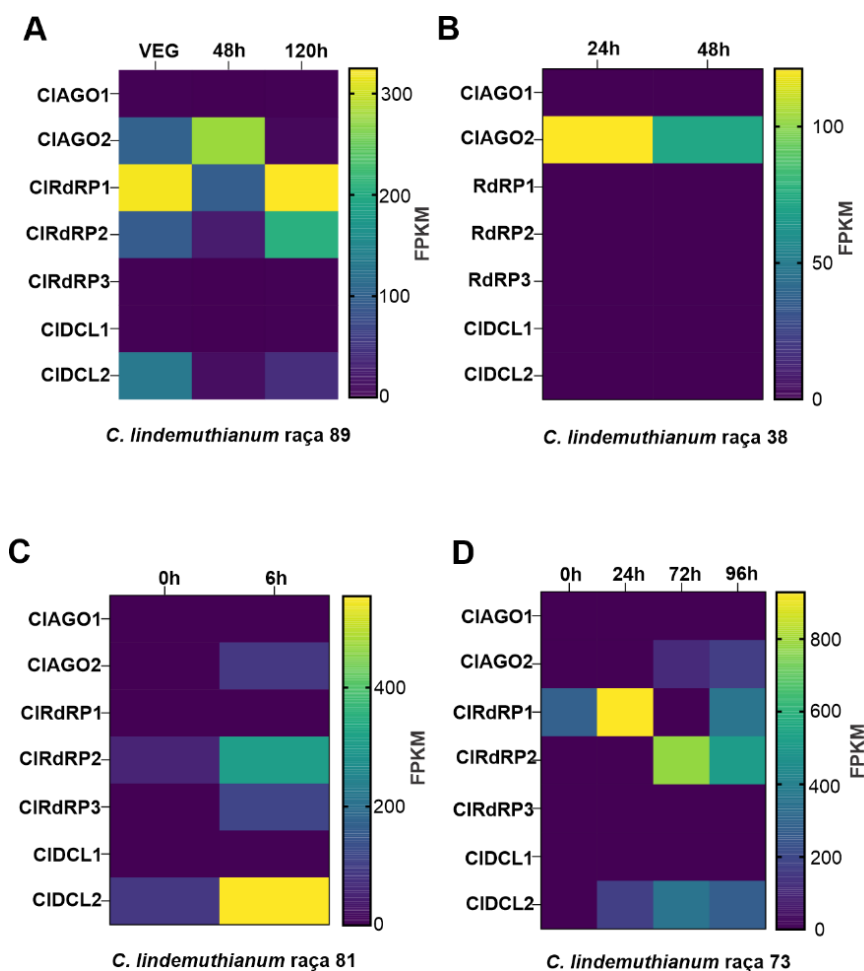
Em relação aos perfis de expressão gênica, observou-se que os genes associados ao mecanismo de interferência por RNA apresentam padrões distintos ao longo das fases de infecção. Em *C. lindemuthianum*, por exemplo, para o isolado da raça 89, não houve expressão de *CIAGO1*, *CIRdRP3* e *CIDCL1* em nenhum dos tempos avaliados. Para o isolado da raça 38, foi detectada expressão apenas de *CIAGO2* durante as fases apressorial e biotrófica, com maior expressão na fase apressorial. Para o isolado da raça 81, observou-se, nas fases iniciais da inoculação (0 a 6 hpi), a expressão de *CIAGO2*, *CIRdRP2* e *CIDCL2*. Curiosamente, dentre os isolados das diferentes raças de *C. lindemuthianum* avaliados, este foi o único que apresentou expressão de *CIRdRP3*, sugerindo que essa enzima possa desempenhar

algum papel nas horas iniciais da infecção nas condições experimentais. Já para o isolado da raça 73, foi detectada a expressão de *CIAGO2*, *CIRdRP1*, *CIRdRP2* e *CIDCL2*. A ausência de expressão de *CIAGO1* e *CIDCL1* em todos os isolados e tempos analisados indicam que essas proteínas possam não contribuir significativamente na interação de *C. lindemuthianum* com o hospedeiro nas condições avaliadas, embora mais estudos sejam necessários, e em outras condições, para determinar o papel funcional dessas proteínas.

No estudo da interação entre linhagens de *C. truncatum* (CMES1059 e CMES1080) e diferentes cultivares de soja (IPRO8372 e IPRO7739), Boufleur et al. (2022) observaram que a severidade da doença variou conforme a combinação específica entre linhagem do fungo e cultivar. A associação de CMES1059 com IPRO8372 e de CMES1080 com IPRO7739 resultou em plantas com menor severidade da doença (fenótipo mais tolerante), enquanto a combinação de CMES1059 com IPRO7739 e de CMES1080 com IPRO8372 levou a plantas mais afetadas (fenótipo mais suscetível). Essas diferenças na resposta da planta foram acompanhadas por alterações no perfil de expressão dos genes da maquinaria de RNAi do fungo. Nas associações envolvendo a linhagem CMES1059, foi observado um padrão de expressão semelhante ao de linhagens de *C. lindemuthianum*, com ausência de expressão de *AGO1*, *RdRP3* (exceto na raça 81, que apresentou expressão em 6 hpi) e *DCL1*. Por outro lado, nas interações com a linhagem CMES1080, foi detectada a expressão de *CtDCL1*, sugerindo que a regulação das proteínas essenciais da maquinaria de RNAi ocorre de forma diferencial, dependendo da linhagem de uma mesma espécie e cultivar que está interagindo.

Em *C. orbiculare*, o perfil de expressão mostrou que, dentre os transcriptomas avaliados, essa foi a única espécie que expressou *CoAGO1*, especificamente em 24 hpi durante a interação com plantas de pepino, fase correspondente ao estágio apressorial do patógeno. Esse padrão sugere que *CoAGO1* pode desempenhar um papel funcional durante essa fase para essa linhagem de *C. orbiculare* nas condições testadas. No entanto, não foi detectada expressão de *CoRdRP3*, *CoDCL1* e *CoAGO2*, em nenhum dos tempos analisados, contrastando o que foi observado nas outras espécies em que *AGO2* foi expressa ao menos em algum momento da interação. Necessitando novas análises para avaliar se este comportamento se mantém.

Figura 7. *Heatmap* dos perfis de expressão das proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA durante a interação com as plantas hospedeiras. **A.** Isolado da raça 89 de *C. lindemuthianum*: crescimento vegetativo (GPYEC, 5 dias) e interação com feijoeiro-comum (48 e 120 hpi); **B.** Isolado da raça 38: 24 e 48 hpi; **C.** Isolado da raça 81: 0 e 6 hpi; **D.** Isolado da raça 73: 0, 24, 72 e 96 hpi. Valores de expressão em FPKM (fragmentos por kilobase de éxon por milhão de fragmentos mapeados).



Esses resultados destacam a complexidade da dinâmica da interação patógeno-hospedeiro, refletida na variação significativa da expressão dos componentes da maquinaria de RNAi entre diferentes linhagens e espécies de *Colletotrichum*, estágios de infecção e hospedeiros. A expressão diferencial de genes, principalmente, como *AGO1*, *RdRP3* e *DCL1* indicam que esses componentes possam possuir outros papéis no ciclo de vida dos fungos.

O mecanismo de RNAi regula uma variedade de processos biológicos em células eucarióticas, incluindo a biossíntese de sRNAs. Na interação fungo-planta, os fitopatogênicos empregam moléculas efetoras, como os sRNAs, para modular o sistema de defesa vegetal e facilitar a infecção. Por outro lado, as plantas também utilizam sRNAs para silenciar genes de virulência do fungo, estabelecendo uma

"batalha molecular" que pode determinar o sucesso ou o fracasso da infecção (Wang & Dean, 2020).

A importância dos sRNAs na regulação da imunidade do hospedeiro já foi demonstrada em diversos patógenos, incluindo *Hyaloperonospora arabidopsidis*, um oomiceto biotrófico obrigatório, no qual foram identificados 34 sRNAs associados ao silenciamento de genes de defesa de *Arabidopsis thaliana* (Dunker et al., 2020). No contexto da patogenicidade de *C. lindemuthianum* e seu estilo de vida hemibiotrófico, é possível que a maquinaria de RNAi atue durante a interação com o hospedeiro, conforme sugerido pela expressão diferencial das proteínas que a compõem. Durante o estágio biotrófico, o patógeno precisa se estabelecer nos tecidos do hospedeiro e suprimir as respostas de defesa da planta. À medida que a infecção progride para o estágio necrotrófico, diversos genes devem ser regulados para garantir o sucesso da colonização e permitir a reprodução do fitopatógeno. Nesse sentido, futuras investigações poderiam focar no estudo dos sRNAs do fungo e da planta durante a interação, proporcionando um maior entendimento da dinâmica do mecanismo de RNAi e seu papel no desenvolvimento da antracnose no feijão-comum.

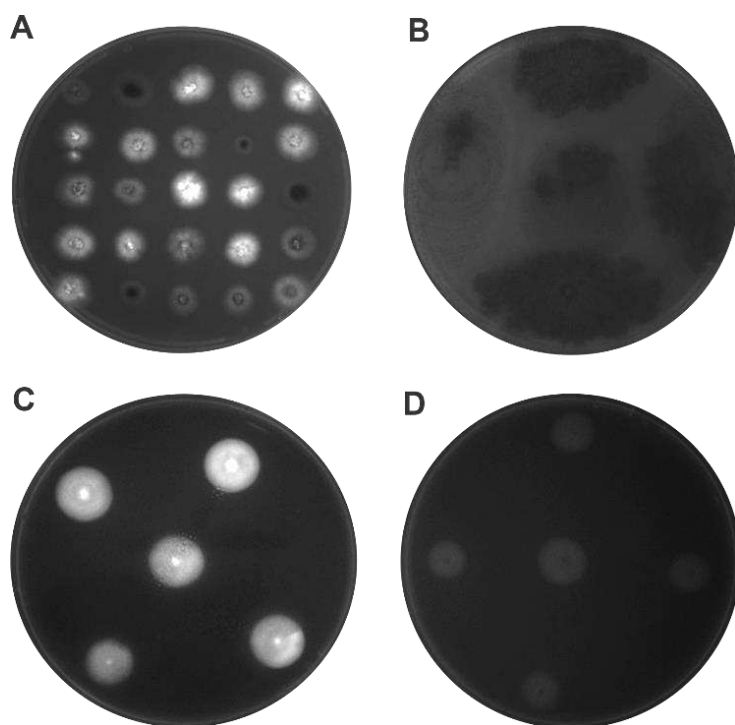
3.3. Transformação de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* com plasmídeo pSM1

A transformação de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum* foi realizada por meio da técnica usando PEG/CaCl₂, juntamente com o plasmídeo pSM1. Esse vetor contém o gene *egfp*, que codifica a proteína verde fluorescente (GFP), e o gene *hph*, responsável pela resistência ao antibiótico higromicina B, permitindo a seleção dos transformantes.

Foram obtidos 80 transformantes para *C. truncatum* e 18 para *C. lindemuthianum* em um período de 8 e 10 dias, respectivamente. A eficiência de transformação atingiu 18 transformantes por micrograma de DNA plasmidial em *C. truncatum*, enquanto para *C. lindemuthianum* essa taxa foi de 1,8 transformantes.µg⁻¹ de plasmídeo. Embora a eficiência de transformação de *C. lindemuthianum* tenha sido consideravelmente inferior a de *C. truncatum* (dez vezes), esse resultado está em conformidade com o estudo relatado por Nogueira et al. (2019), que obtiveram uma eficiência de 1,0 transformante.µg⁻¹ do plasmídeo (pSM1) para a linhagem.

Alguns dos isolados transformantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido de higromicina, e após o crescimento das colônias as placas foram expostas a luz de fluorescência em fotodocumentador L-Pix Ex (Loccus), como ilustrado na figura 8. A confirmação dos transformantes foi realizada também com a amplificação dos genes *egfp* e *hph*.

Figura 8. Isolados transformantes expressando a proteína GFP comparados as linhagens selvagens. **A.** Isolados de *C. truncatum* GFP+; **B.** Colônias do isolado de *C. truncatum* selvagem que não expressam GFP; **C.** Isolados de *C. lindemuthianum* GFP+; **D.** Colônias do isolado selvagem de *C. lindemuthianum* que não expressam GFP.

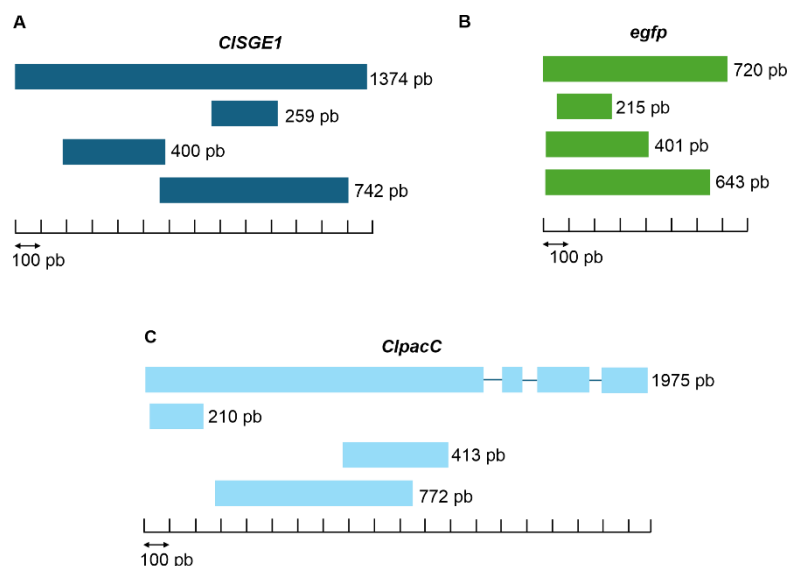


3.4. Produção dos dsRNAs

Para a construção dos cassetes, foram desenhados *primers* específicos contendo, em suas extremidades 5', a sequência mínima promotora reconhecida pela RNA polimerase T7 (apêndice A). Os *primers* foram projetados para amplificar três fragmentos de tamanhos diferentes de parte da região codificadora dos genes-alvo (*egfp*, *CISGE1* e *ClpacC*): aproximadamente 200 pb, 400 pb e 700 pb (Figura 9). Esses

tamanhos foram escolhidos para analisar a influência do comprimento dos dsRNAs na eficiência do silenciamento.

Figura 9. Representação esquemática das regiões amplificadas a partir das sequências codificadoras dos genes *egfp*, *CISGE1* e *ClpacC*. **A.** Fragmentos de 259, 400 e 742 pb amplificados a partir da sequência codificadora de *CISGE1*; **B.** Fragmentos de 215, 401 e 643 pb amplificados a partir da sequência codificadora de *egfp*; **C.** Representação dos íntrons em *ClpacC* e dos fragmentos de 210, 413 e 772 pb amplificados a partir da sequência codificadora. O maior fragmento corresponde a sequência completa da região codificadora de cada gene.



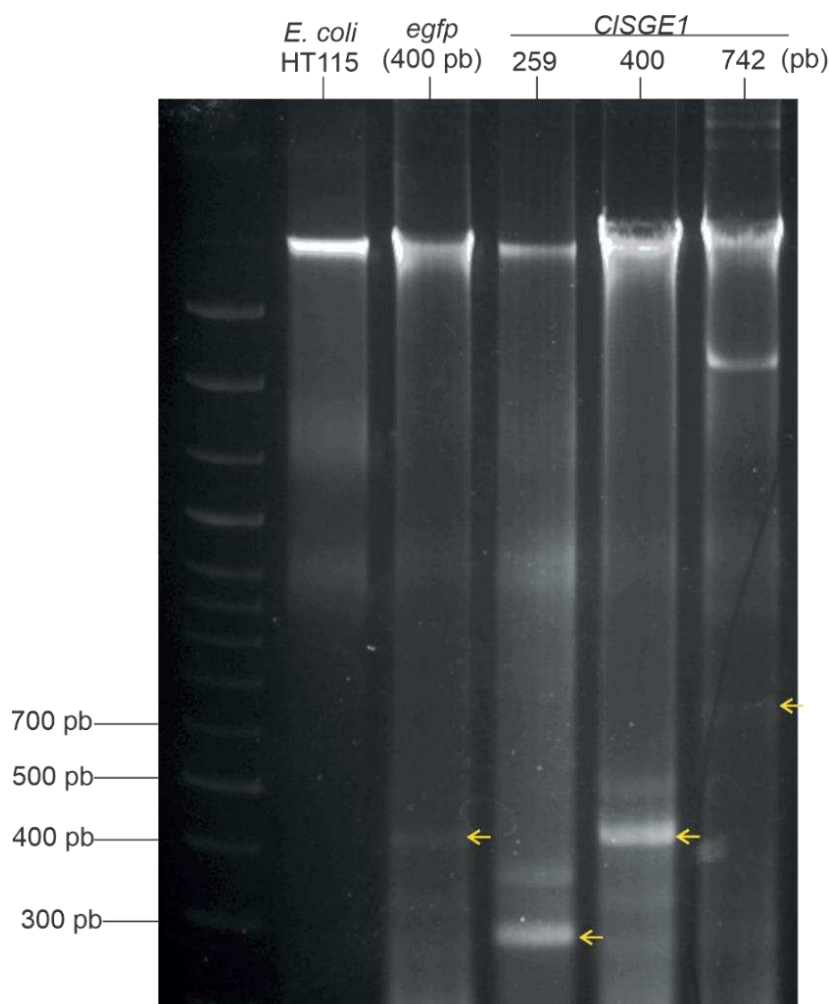
Para testar a metodologia de expressão de dsRNAs em *E.coli* HT115 (linhagem deficiente em RNase III), inicialmente foram selecionados apenas alguns fragmentos: *egfp* (401 pb) e três fragmentos do gene *CISGE1* (259, 400 e 742 pb). Estes fragmentos foram clonados no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega), e os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *E. coli* HT115.

Alguns testes foram conduzidos para otimizar a síntese *in vivo* dos dsRNAs (dados não mostrados), entre eles, o uso do meio LB (1 e 2x) e a substituição da ampicilina pela carbenicilina. Além disso, foram realizados diversos testes para otimizar a extração dos dsRNAs, incluindo diferentes protocolos: (I) utilização do manual do fabricante do reagente TRIzol (Invitrogen); (II) lise térmica das células bacterianas seguida de purificação com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito por Ahn et al. (2019); (III) extração com o kit Quick-DNA/RNA MagBead (Zymo); (IV) extração com o kit RNeasy (Qiagen); (V) protocolo baseado em sílica

(Oliveira et al., 2025). Os resultados de alguns desses testes estão apresentados no Apêndice D.

Apesar dos diversos esforços para otimizar a metodologia, a expressão dos dsRNAs foi detectada apenas em níveis baixos quando as células foram cultivadas em meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e a extração foi realizada com TRIzol (Figura 10).

Figura 10. Expressão de dsRNAs em linhagens transformantes de *E. coli* HT115. As linhagens de *E. coli* HT115 foram transformadas para expressar dsRNAs direcionados a *egfp* (401 pb) e a *CISGE1* (259, 400 e 742 pb). Como controle, foi utilizada a mesma linhagem sem o vetor. As setas em amarelo mostram as bandas correspondentes aos dsRNAs expressos. A escala a esquerda indica o tamanho das bandas, referenciado pelo marcador de peso molecular utilizado (1 kb Ladder Plus – Sinapse Ino.).



A produção de dsRNAs *in vivo* em *E. coli* HT115 requer a indução por IPTG, que induz a expressão da RNA polimerase T7 presente no cromossomo bacteriano. No entanto, concentrações elevadas desse indutor podem causar estresse metabólico e

toxicidade celular, reduzindo a viabilidade das células e consequentemente a produção de dsRNAs (Dvorak et al., 2015; Hanning & Makrides, 1998; Nwokeoji et al., 2022). Considerando esses fatores, neste estudo adotou-se a concentração final de 0,4 mM de IPTG, previamente descrita em diversos ensaios visando a síntese de dsRNAs sem induzir efeitos adversos significativos (Tian et al., 2009; Da Rosa et al., 2024).

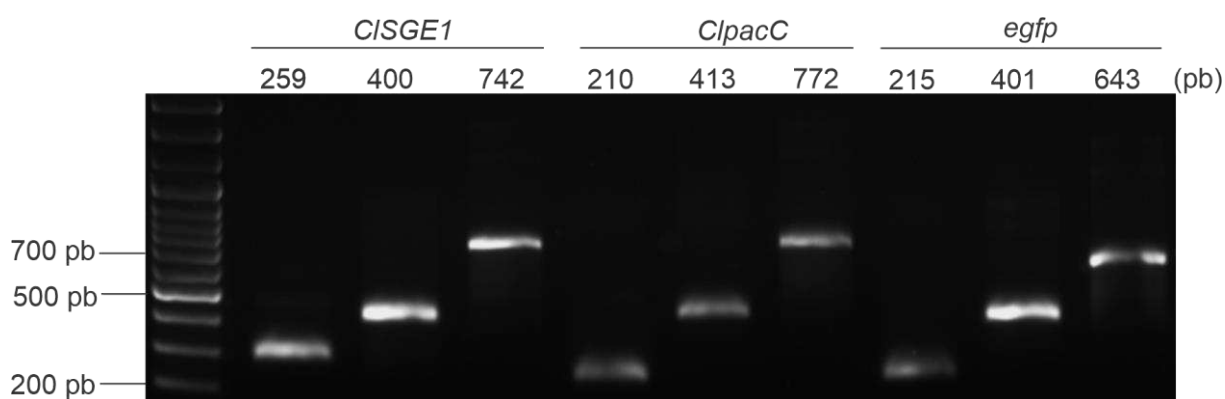
Além da indução, o meio de cultivo influencia diretamente na produção de dsRNAs. No presente estudo, utilizou-se o meio LB, amplamente empregado para a expressão de proteínas e dsRNAs (Ma et al., 2020; Papic et al., 2018). No entanto, estudos recentes, como o de Da Rosa et al. (2024), demonstraram que o meio de cultivo caldo Terrific (TB) pode aumentar significativamente o rendimento da produção de dsRNAs, alcançando $31,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, um valor 118% superior ao obtido em meio LB ($14,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Além disso, o mesmo estudo mostrou que modificações no vetor de expressão, por meio da inserção de sequências terminadoras *upstream* de cada promotor T7, leva a terminação adequada da transcrição. Na ausência desses terminadores, a RNA polimerase T7 pode continuar transcrevendo sequências do vetor além do inserto, resultando na síntese de dsRNAs com tamanhos mais longos que o esperado.

Observando a Figura 10, nota-se bandas adicionais para alguns dos dsRNAs (*egfp* de 401 pb, *CISGE1* de 259 e 400 pb), mostrando a presença de dsRNAs de maior tamanho, provavelmente contendo sequências não desejadas do plasmídeo. A inserção de sequências no transcrito que não são a do gene-alvo, pode levar ao silenciamento fora do alvo, o que não é uma característica desejável visando aplicação dos dsRNAs.

Adicionalmente, o vetor pGEM-T Easy, utilizado para as construções, quando linearizado, apresenta um promotor T7 em uma de suas extremidades. Com a inserção do fragmento de interesse, que já contém promotores T7 flanqueando a sequência alvo em direções opostas, ocorre o posicionamento consecutivo dos dois promotores T7 em um dos sentidos da transcrição. Essa configuração pode resultar no sequestro da RNA polimerase T7 ou na colisão entre as enzimas durante a transcrição (Callen et al., 2004), o que levaria a terminação prematura e levando a geração de fragmentos truncados (Chatterjee et al., 2011). O que também pode ter ocorrido nos ensaios, sendo uma possível explicação pelo baixo rendimento.

Diante dos desafios associados a produção de dsRNAs *in vivo*, optou-se pela síntese de dsRNAs por transcrição *in vitro*, utilizando o kit Megascript RNAi. Esse método além da síntese dos dsRNAs, também inclui uma etapa de purificação por coluna, garantindo maior pureza. Utilizando essa abordagem, foram produzidos dsRNAs correspondentes aos nove fragmentos de interesse, conforme ilustrado anteriormente na Figura 9. Os dsRNAs purificados estão representados na Figura 11.

Figura 11. Corrida em gel de agarose a 1,5% dos dsRNAs sintetizados *in vitro* a partir do kit Megascript RNAi. O marcador de peso molecular a esquerda representa os tamanhos dos dsRNAs (100 bp DNA Ladder – Sinapse Ino.).



O rendimento médio das reações foi de $122 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, em um volume final de $100 \mu\text{L}$, totalizando $12,2 \mu\text{g}$ de dsRNA sintetizado por reação. No entanto, observou-se uma variação significativa no rendimento entre os diferentes fragmentos. A reação de maior rendimento foi a do fragmento *CISGE1*-742 pb, com $580 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, enquanto a de menor rendimento foi a do fragmento *CISGE1*-259 pb, com $66 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Todas as amostras foram quantificadas por Qubit. De acordo com o manual do fabricante, o rendimento total médio esperado para um fragmento controle de 500 pb é de $50 \mu\text{g}$ ou superior, indicando que os rendimentos obtidos neste estudo estão abaixo do esperado, o que limitou os testes realizados.

O custo do kit Megascript RNAi em 2025 no Brasil é de R\$ 4.667,72 para 20 reações, resultando em um valor de R\$ 233,35 por reação. Com um rendimento médio de $12,2 \mu\text{g}$ de dsRNA por reação, o custo estimado por micrograma que foi produzido é de R\$ 19,13. Esse valor é elevado, especialmente considerando a concentração de uso recomendada de $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Koch et al., 2019; Werner et al., 2020), tornando o uso do kit economicamente inviável para aplicações em larga escala.

Diante disso, torna-se essencial a otimização da produção de dsRNAs *in vivo*, explorando estratégias como a modificação do vetor de expressão para incluir sequências terminadoras flanqueando os promotores T7, a avaliação de diferentes meios de cultura, ajustes na concentração do indutor ou a substituição por promotores constitutivos. Essas abordagens podem reduzir significativamente os custos, uma vez que estudos relatam valores substancialmente inferiores, como a produção de 1 g de dsRNA por US\$ 4,00 (Zotti & Guy, 2018; Verdonckt & Vanden, 2022).

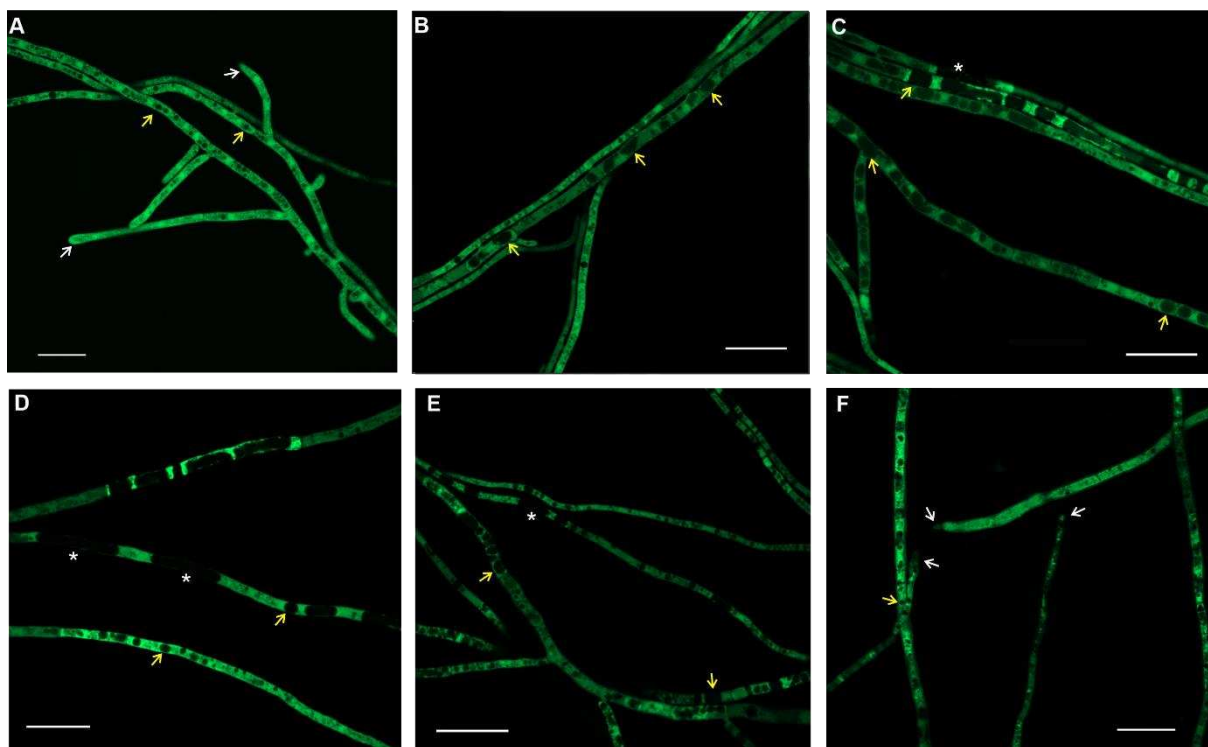
3.5. Teste de captação de dsRNA em *C. lindemuthianum*

O teste de captação foi conduzido utilizando um isolado transformante de *C. lindemuthianum* que expressa GFP. Para isso, foram realizados microcultivos nos quais os dsRNAs, direcionados ao gene *egfp*, foram misturados aos conídios. Como controle negativo, utilizou-se um dsRNA de 742 pb direcionado ao gene *CISGE1*, além da inoculação dos conídios sem a presença de dsRNAs.

Os resultados visuais da redução da fluorescência não foram claramente perceptíveis em todos os tratamentos (Figura 12). No entanto, nas hifas tratadas com os dsRNAs direcionados ao gene *egfp*, observou-se a formação de numerosos vacúolos e de grande tamanho, bem como a ausência de fluorescência em determinados segmentos das hifas. No controle negativo, tratado com dsRNA-*CISGE1*, também foram identificados vacúolos, em maior número e tamanho em comparação com o controle sem dsRNA. No entanto, a quantidade de vacúolos foi menor em relação aos tratamentos com dsRNAs-*egfp*, sugere-se que a presença dos dsRNAs induziu um efeito sobre as hifas, resultando na formação de vacúolos como possível resposta ao estresse fisiológico.

As pontas das hifas tratadas com dsRNA-*egfp* de 643 pb apresentaram menor emissão de fluorescência em comparação as pontas das hifas dos controles (Figura 12: A, B e F). Um padrão semelhante foi observado no estudo de Wytinck et al. (2020), no qual hifas de *S. sclerotiorum* que expressavam GFP, quando tratadas com dsRNA-*egfp*, exibiram uma perda de fluorescência mais acentuada nas pontas, indicando que ou essa região pode ser a mais ativa no processo de silenciamento, ou haver um acúmulo preferencial dos dsRNAs. Porém, não houve relato de aumento do número de vacúolos nos ensaios.

Figura 12. Teste de captação de dsRNAs em *C. lindemuthianum* expressando GFP. **A.** Controle negativo, cultivo sem a presença de dsRNAs; **B.** Controle negativo, cultivo com dsRNA-*CISGE1*-742 pb; **C.** Cultivo com dsRNA-egfp-215 pb; **D.** Cultivo com dsRNA-egfp-401 pb; **E.** Cultivo com dsRNA-egfp-643 pb; **F.** Pontas das hifas com menor emissão de fluorescência tratadas com dsRNA-egfp-643pb. As setas amarelas indicam vacúolos, os “*” destacam os segmentos sem fluorescência e as setas brancas apontam para as pontas das hifas. Barras de escala: 20 µm.



O aumento no número e no tamanho dos vacúolos observado neste estudo está em concordância com os achados de Jiang et al. (2022), que relataram a formação de grandes vacúolos em hifas de uma linhagem de *Aspergillus flavus* infectada pelo micovírus AfPV1, pertencente da família *Partitiviridae*. Considerando que os vírus dessa família possuem como material genético dsRNAs, é possível que o aumento dos vacúolos esteja relacionado a resposta de ativação da maquinaria de interferência de RNA contra o micovírus, já que este mecanismo, conhecidamente, faz parte da defesa antiviral em células eucarióticas. Dessa forma, os resultados do presente trabalho sugerem que *C. lindemuthianum* foi capaz de perceber o dsRNA exógeno e desencadear uma resposta fisiológica, como aumento do número e tamanho dos vacúolos.

Além disso, os achados de Zheng et al. (2025) reforçam essa hipótese, uma vez que demonstraram que o tratamento com dsRNA desencadeia vias canônicas de estresse fúngico em *M. oryzae*. Esses resultados apontam que a captação de dsRNAs

pode ativar mecanismos celulares de resposta ao estresse em diferentes espécies de fungos.

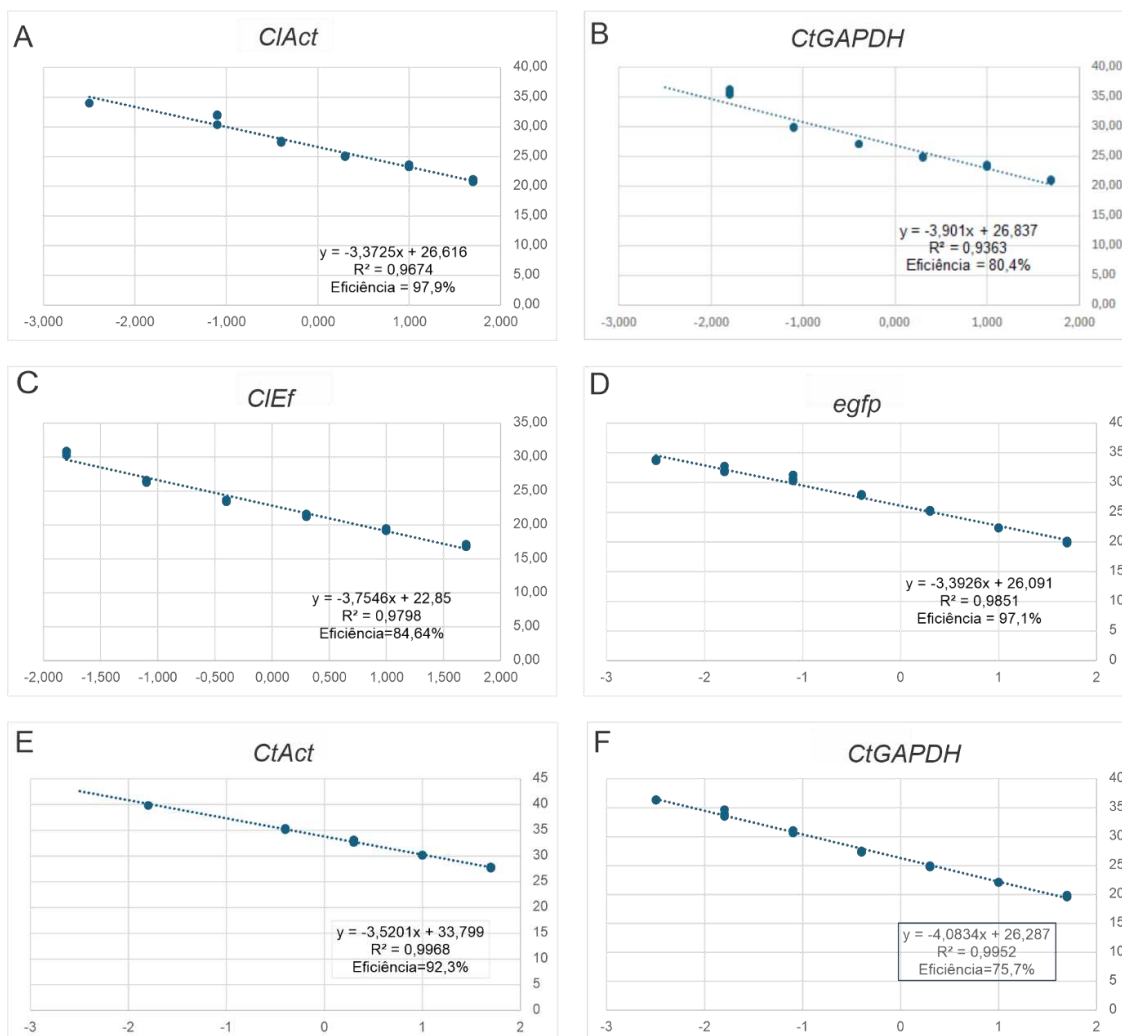
Foi realizado um outro ensaio de microcultivo anterior a este, no qual tratou-se com dsRNA-egfp isolados de *C. truncatum* e *C. lindemuthianum* que expressavam GFP. Porém o isolado utilizado de *C. lindemuthianum* que fazia parte da coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/Bioagro – UFV não apresentou fluorescência suficiente para análises mais detalhadas, o que gerou incertezas e impediu o aproveitamento dos resultados, tornando necessária uma nova transformação. Por outro lado, o isolado de *C. truncatum* GFP⁺ apresentou um aumento no número de vacúolos (Apêndice E), e há relatos prévios que descrevem a capacidade dessa espécie de captar dsRNAs (Gu et al., 2019), reforçando a indicação que o aumento de vacúolos pode estar relacionado a resposta aos dsRNAs.

3.6. Padronização dos *primers* e análise da expressão gênica por qPCR

Para analisar a expressão do gene *egfp* em *C.lindemuthianum* GFP⁺ e *C. truncatum* GFP⁺, foram desenhados *primers* específicos para a região codificadora do gene *egfp* e para genes endógenos, utilizados na normalização dos dados de expressão (Apêndice A).

Os isolados tiveram seu RNA total extraído, tratados com DNase e posteriormente foi realizada a síntese do cDNA utilizando oligo dT. Os *primers* foram então avaliados quanto sua eficiência, que deveria estar dentro da faixa ideal de 90 a 110%. Os valores obtidos foram de 97,9% e 92,3% para os genes endógenos da actina de *C. lindemuthianum* e *C. truncatum*, respectivamente, e de 97,1% para o gene *egfp* (Figura 13).

Figura 13. Ensaio de eficiência dos *primers* utilizados na análise de expressão gênica. **A.** Actina de *C. lindemuthianum*; **B.** GAPDH de *C. lindemuthianum*; **C.** Fator de alongação de *C. lindemuthianum*; **D.** Gene *egfp*; **E.** Actina de *C. truncatum*; **F.** GAPDH de *C. truncatum*.

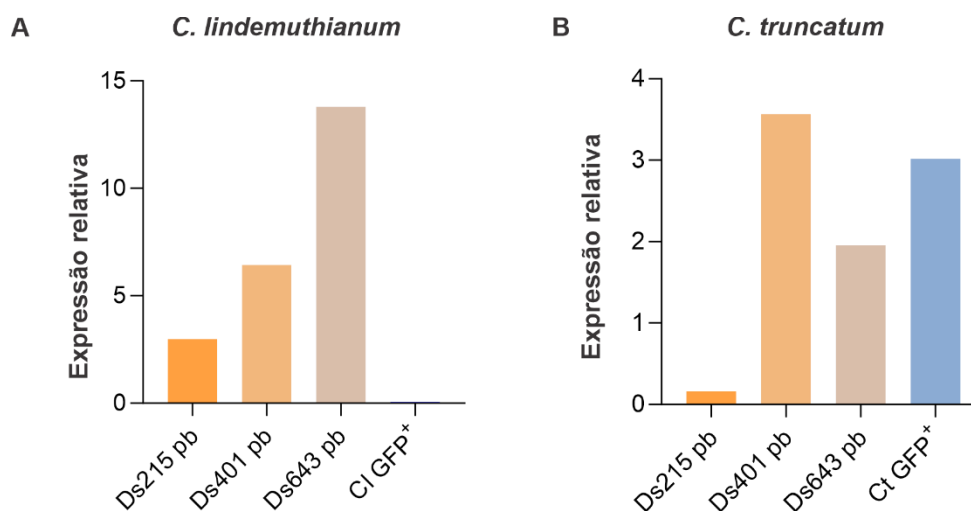


O ensaio para a análise da expressão gênica foi realizado misturando os dsRNAs-*egfp* com esporos dos isolados de *C. lindemuthianum* GFP⁺ e *C. truncatum* GFP⁺. Como controle, os conídios foram inoculados na ausência de dsRNA. Devido ao baixo rendimento na síntese de dsRNAs, os experimentos foram realizados em microtubos de 1,5 mL, com um volume final de 100 µL, obtido pela mistura do meio de cultura com os dsRNAs, visando atingir uma concentração final de 20 ng.µL⁻¹ de dsRNA. Testes preliminares haviam sido realizados (sem o tratamento) para confirmar que esse pequeno volume permitiria a extração do RNA total das amostras, o que foi possível.

A análise da expressão relativa do gene *egfp* por qPCR, após o tratamento com dsRNA, não apresentou o padrão esperado de silenciamento. Em vez da redução da

expressão, observou-se um aumento nos níveis de transcritos de *egfp* nas amostras tratadas com dsRNA-*egfp*, em comparação com os controles negativos (sem dsRNA) (Figura 14).

Figura 14. Expressão relativa do gene *egfp* após tratamento com dsRNA-*egfp* em *C. lindemuthianum* e *C. truncatum*. **A.** Níveis de expressão em *C. lindemuthianum* após o tratamento com dsRNA-*egfp*; **B.** Níveis de expressão em *C. truncatum* após o tratamento com dsRNA-*egfp*. Os dados foram normalizados utilizando o gene da actina como controle endógeno para cada isolado, conforme a curva padrão obtida.



A expressão gênica entre os isolados apresentou diferenças, sendo que, no controle negativo de *C. lindemuthianum* (CI GFP⁺), a expressão não foi detectada após a normalização, enquanto na amostra sem tratamento de *C. truncatum* (Ct GFP⁺), a expressão foi observada. Assim, observou-se uma redução nos níveis de expressão com o tratamento com dsRNA-*egfp* de 215 e 643 pb, indicando redução do número de transcritos. No entanto, para o tratamento com dsRNA-*egfp* de 401 pb o resultado não foi consistente com o esperado para o silenciamento gênico, especialmente considerando que *C. truncatum* é uma espécie reconhecida por sua capacidade de captar e processar dsRNAs (Gu et al., 2019).

Não foi possível determinar com precisão a causa desse resultado dentro das condições experimentais utilizadas. Estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer essa questão. Uma abordagem relevante seria o tratamento das hifas com RNase antes da extração do RNA total, garantindo a degradação de qualquer dsRNA externo residual e eliminando sua possível influência na análise da expressão. Além disso, a inclusão de um controle na qPCR contendo somente dsRNA purificado permitiria verificar se o dsRNA está sendo amplificado e contribuindo para os

resultados observados. Outra estratégia seria repetir o ensaio em um volume maior, o que garantiria que a concentração dos transcritos seja suficiente para minimizar variações e reduzir possíveis erros associados a quantificação. Essas abordagens complementares podem ajudar a esclarecer se o dsRNA residual está interferindo nos resultados ou se outros fatores estariam envolvidos.

Outros métodos também podem ser utilizados para avaliar a captação e o processamento de dsRNAs, seja de forma direta ou indireta. O método direto mais utilizado consiste na marcação dos dsRNAs com fluoróforo, seguida do tratamento dos isolados com esses dsRNAs. Após a incubação, as hifas são tratadas com RNase e submetidas a protoplastização, permitindo a análise dos protoplastos por microscopia de fluorescência (Wang et al., 2016; Wytinck e al., 2020; Zheng et al., 2025).

Já a abordagem indireta pode ser realizada por meio da adição de um dsRNA específico ao meio de cultivo em placas de Petri. Esse dsRNA deve ser direcionado a um gene essencial para o desenvolvimento micelial, como o gene da β -tubulina, possibilitando a avaliação da captação e do processamento do dsRNA com base no crescimento da colônia observado (Gu et al., 2019).

3.7. Teste de inibição *in vivo*

Ensaio de inibição *in vivo* foram conduzidos em paralelo. Folhas destacadas de feijão-comum foram inoculadas com conídios da linhagem selvagem de *C. lindemuthianum* e, após 12 horas, submetidas a pulverização dos dsRNAs, utilizando suspensões contendo $4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de dsRNA. Como controle, foram empregadas folhas não inoculadas pulverizadas com água, além de folhas inoculadas pulverizadas com água ou com o dsRNA-*egfp* de 415 pb.

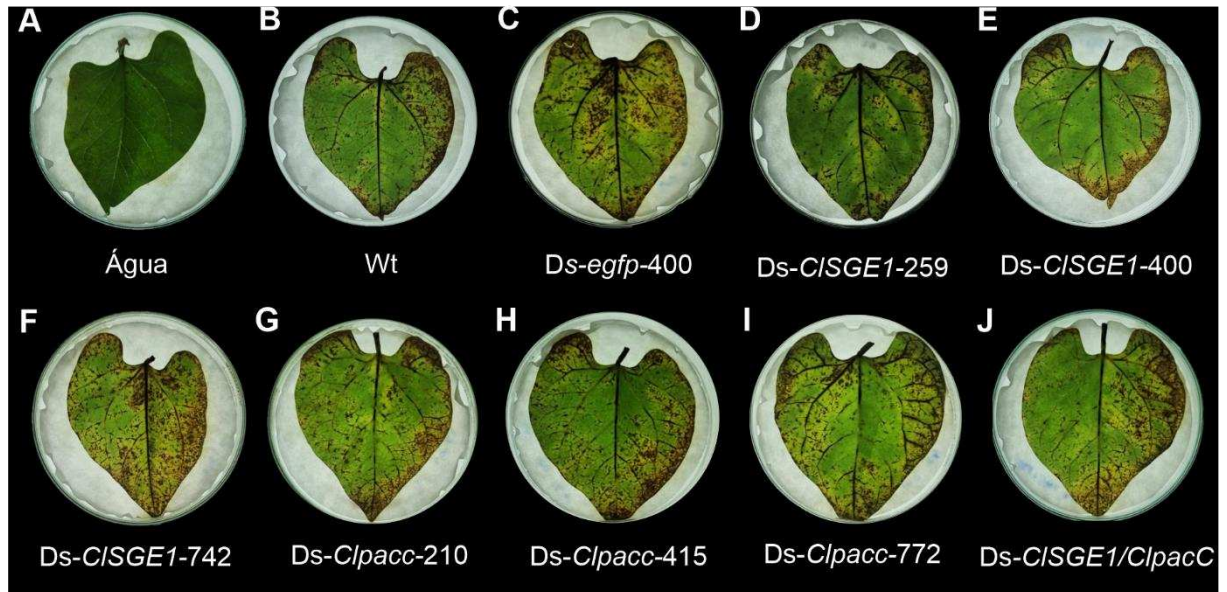
Apesar da aplicação dos dsRNAs, a severidade dos sintomas nas folhas tratadas foi semelhante ao observado nos controles inoculados, pulverizados com água ou dsRNA-*egfp* (Figura 15B e C), sem diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (Figura 15K). Isso sugere que, nas condições testadas, o tratamento com dsRNA não foi eficiente em reduzir a severidade da antracnose. Uma possível explicação para esse resultado poderia estar relacionada a concentração de dsRNA utilizada, que foi

menor do que é comumente relatada na literatura ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Duanis-Assaf et al., 2022; Koch et al., 2016; Qiao et al., 2023).

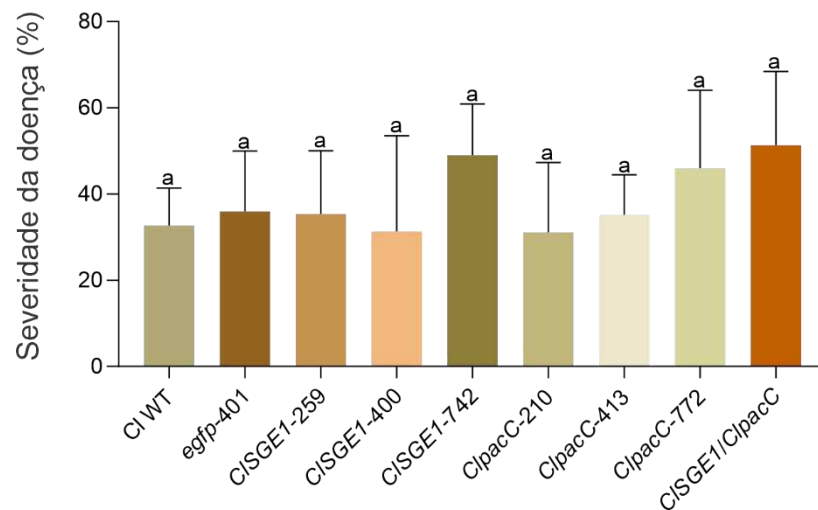
Outro aspecto importante refere-se à estabilidade do dsRNA na superfície das folhas. Condições ambientais, como a presença de nucleases, podem ter contribuído para a degradação do dsRNA antes que fosse captado pelo fungo. Estudos como o de Bachman et al. (2020) demonstraram que o dsRNA foi degradado em 95% após três dias de tratamento, enquanto Mitter et al. (2017) relataram que o dsRNA desprotegido permaneceu viável por apenas cinco dias após pulverização. Além disso, a capacidade de absorção de dsRNA por *C. lindemuthianum* ainda não é completamente entendida, o que limita conclusões mais aprofundadas.

Embora os resultados não tenham demonstrado eficácia na redução da severidade da antracnose, este estudo contribui para a compreensão dos desafios associados ao uso de dsRNA como estratégia de controle de fitopatógenos. Estudos futuros podem explorar a captação de dsRNAs por *C. lindemuthianum*, testar diferentes concentrações no tratamento, avaliar os efeitos fisiológicos do fungo, além de investigar a aplicação por pulverização em diferentes estágios da infecção e métodos alternativos de entrega, como nanopartículas de argila (BioClay™) (Niño-Sánchez et al., 2022), nanopartículas de quitosana (Zhou et al., 2023), entre outros. Além disso, é essencial aprofundar o entendimento dos componentes-chave da maquinaria de interferência envolvidos nesse processo, com a análise funcional.

Figura 15. Ensaio de inibição *in vivo* por pulverização de dsRNAs em folhas de feijão-comum. **A.** Folha não inoculada pulverizada com água; **B.** Folha inoculada pulverizada com água; **C.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*egfp* (401 pb); **D.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*CISGE1* (259 pb); **E.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*CISGE1* (400 pb); **F.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*CISGE1* (742 pb); **G.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*ClpacC* (210 pb); **H.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*ClpacC* (413 pb); **I.** Folha inoculada pulverizada com dsRNA-*ClpacC* (772 pb); **J.** Folha inoculada pulverizada com dsRNAs direcionados a *CISGE1* e *ClpacC*, contendo todos os fragmentos; **K.** Gráfico da severidade da antracnose em folhas de feijão-comum pulverizadas com dsRNA. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). A severidade da doença foi quantificada por meio do software QUANT V.1.0.1.



K



4. CONCLUSÃO

Com base no genoma de *C. lindemuthianum*, foi possível identificar proteínas-chave da maquinaria de RNA de interferência que ainda não haviam sido descritas para essa espécie, como AGO2, RdRP2 e RdRP3. Essas proteínas exibem domínios altamente conservados, indicando uma pressão seletiva para a manutenção desses genes.

A análise dos transcriptomas da interação fungo-planta indica que genes como *AGO1*, *RdRP3* e *DCL1* são expressos em condições e linhagens específicas.

A utilização da linhagem de *E. coli* HT115 foi capaz de produzir dsRNAs, porém a utilização do vetor pGEM T-Easy não foi eficiente.

A síntese de dsRNA pelo kit comercial Megascript RNAi apresentou baixo rendimento nas condições avaliadas.

Os resultados relacionados a captação de dsRNA por *C. lindemuthianum* não foram conclusivos, porém sugerem que o fungo foi capaz de perceber os dsRNAs exógeno, e gerar resposta fisiológica, evidenciado pelo aumento no tamanho e no número de vacúolos.

Por fim, a aplicação de dsRNAs em concentrações de 4 ng.µL⁻¹ não foram eficazes para o controle da antracnose, podendo ser testadas novas concentrações. Dessa forma, este estudo contribui para o entendimento dos desafios na padronização do sistema de silenciamento gênico visando o controle de fitopatógenos e inicia as investigações desse método de controle para *C. lindemuthianum*.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.J. et al. Microbial-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management. *International Journal of Insect Science*, v. 11, p. 1179543319840323, 2019.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. D. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão Documentos (INFOTECA-E), 2012.
- BHAGTA, S.; BHARDWAJ, V.; KANT, A. Exogenous dsRNA trigger RNAi in *Venturia inaequalis* resulting in down regulation of target genes and growth reduction. *Molecular Biology Reports*, v. 50, n. 10, p. 8421-8429, 2023.
- BORDOGNA, A.; PANDINI, A.; BONATI, L. Predicting the accuracy of protein–ligand docking on homology models. *Journal of Computational Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 81-98, 2011.
- BORGES, F.; MARTIENSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 12, p. 727-741, 2015.
- BOUFLEUR, T. R. et al. Comparative transcriptomic provides novel insights into the soybean response to *Colletotrichum truncatum* infection. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 1046418, 2022.
- BUCHON, N.; VAURY, C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*, v. 96, n. 2, p. 195-202, 2006.
- CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST, H. N. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, v. 203, p. 346-353, 1986.
- CAMPO, S.; GILBERT, K. B.; CARRINGTON, J. C. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 6, p. e1005640, 2016.
- CALLEN, B. P.; SHEARWIN, K. E.; EGAN, J. B. Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Molecular Cell*, v. 14, n. 5, p. 647-656, 2004.
- CARMELL, M. A.; HANNON, G.J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 11, n. 3, p. 214-218, 2004.
- CHANG, Y. et al. Global transcriptome analysis reveals resistance genes in the early response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Colletotrichum lindemuthianum*. *BMC Genomics*, v. 25, n. 1, p. 579, 2024.

CHATTERJEE, A. et al. Convergent transcription confers a bistable switch in *Enterococcus faecalis* conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 23, p. 9721-9726, 2011.

CHOI, J. et al. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*, v. 15, p. 1-10, 2014.

COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 19, p. 10233-10238, 1997.

DA ROSA, J. et al. Optimizing dsRNA engineering strategies and production in *E. coli* HT115 (DE3). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. kuae028, 2024.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity*, v. 61, p. 29-59, 2013.

DANG, Y. et al. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, v. 10, n. 9, p. 1148-1155, 2011.

DELANO, W. L. PyMOL Reference Guide. California, USA, Scientific, 2004.

DUANIS-ASSAF, D. et al. Double-stranded RNA targeting fungal ergosterol biosynthesis pathway controls *Botrytis cinerea* and postharvest grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, v. 20, n. 1, p. 226-237, 2022.

DUNKER, F. et al. Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence. *Elife*, v. 9, p. e56096, 2020.

DVORAK, P. et al. Exacerbação da toxicidade do substrato por IPTG em *Escherichia coli* BL21 (DE3) carregando uma via metabólica sintética. *Microbial Cell Factories*, v. 14, p. 1-15, 2015.

GAN, P. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist*, v. 197, n. 4, p. 1236-1249, 2013.

GU, S. et al. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Current Biology*, v. 22, n. 16, p. 1536-1542, 2012.

GU, K. X. et al. A β 2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 153, p. 36-46, 2019.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 54-60, 1998.

HÖFLE, L. et al. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. *RNA Biology*, v. 17, n. 4, p. 463-473, 2020.

HUANG, G. et al. Bistable expression of WOR1, a master regulator of white–opaque switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 34, p. 12813-12818, 2006.

IRIEDA, H. et al. *Colletotrichum orbiculare* secretes virulence effectors to a biotrophic interface at the primary hyphal neck via exocytosis coupled with SEC22-mediated traffic. *The Plant Cell*, v. 26, n. 5, p. 2265-2281, 2014.

JIANG, Y. et al. A satellite dsRNA attenuates the induction of helper virus-mediated symptoms in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 895844, 2022.

JURADO, M.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Differentially expressed genes against *Colletotrichum lindemuthianum* in a bean genotype carrying the Co-2 gene revealed by RNA-sequencing analysis. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 981517, 2022.

KÄMPER, J. et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, v. 444, n. 7115, p. 97-101, 2006.

Koch, A. et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathogens* 12, n. 10, e1005901, 2016.

KOCH, A. et al. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 20, n. 12, p. 1636-1644, 2019.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, v. 10, p. 1-10, 2009.

LEE, D. W. et al. An argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics*, v. 164, n. 2, p. 821, 2003.

LI, L.; CHANG, S.; LIU, Yi. RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, p. 3849-3863, 2010.

MA, Z. et al. A novel plasmid–*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing. *Pest Management Science*, v. 76, n. 7, p. 2505-2512, 2020.

MARTINIANO-SOUZA, M. C. et al. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing its regions. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, n. 60, 2017.

MATZKE, M. A.; BIRCHLER, James A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 1, p. 24-35, 2005.

- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 343-349, 2004.
- MEZZETTI, B. et al. RNAi: What is its position in agriculture? *Journal of Pest Science*, v. 93, n. 4, p. 1125-1130, 2020.
- MICHIELSE, C. B. et al. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 10, p. e1000637, 2009.
- MITTER, N. et al. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. *Current Opinion in Virology*, v. 26, p. 49-55, 2017.
- MORALES, F. J. Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. *Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 425-445, 2003.
- NERVA, L. et al. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: Effectiveness of different application methods in an open-air environment. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 200, 2020.
- NOGUEIRA, G. B. et al. The histidine kinase slnCl1 of *Colletotrichum lindemuthianum* as a pathogenicity factor against *Phaseolus vulgaris* L. *Microbiological Research*, v. 219, p. 110-122, 2019.
- OLIVEIRA, C. N. et al. Identification of a novel polymycovirus infecting the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Archives of Virology*, v. 170, n. 3, p. 58, 2025.
- PAYSAN-LAFOSSE, T. et al. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D418-D427, 2023.
- PAPIĆ, L. et al. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnology Reports*, v. 20, p. e00292, 2018.
- PADDER, B. A.; SHARMA P. N.; AWALE H. E.; KELLY J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *The Journal of Plant Pathology*. V. 99, p.317–330, 2017.
- PÖGGELER, S. et al. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Current Genetics*, v. 43, p. 54-61, 2003.
- POWELL, H. R. et al. Phyre2. 2: A community resource for template-based protein structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, p. 168960, 2025.
- QIAO, L. et al. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, v. 19, n. 9, p. 1756-1768, 2021.

- REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology*, v. 18, n. 3, p. 230-246, 1994.
- RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; RAMÍREZ-RUEDA, M. T.; DE LA VEGA, O. M.; SIMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology*, v.52, n.2, 228-235, 2003.
- RODRIGUEZ, R. J.; YODER, O. C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene*, v. 54, n. 1, p. 73-81, 1987.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SILVA, L. L. et al. Use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for the inactivation of pectinase genes in *Colletotrichum lindemuthianum*. *European Journal of Plant Pathology*, p. 1-14, 2021.
- SILVA, L. L. et al. Pectinolytic arsenal of *Colletotrichum lindemuthianum* and other fungi with different lifestyles. *Journal of Applied Microbiology*, v. 133, n. 3, p. 1857-1871, 2022.
- SILVA, L. L. et al. What lies behind the large genome of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Frontiers in Fungal Biology*, v. 5, p. 1459229, 2024.
- SOARES, M. A. et al. PacCI, a pH-responsive transcriptional regulator, is essential in the pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum*, a causal agent of anthracnose in bean plants. *European Journal of Plant Pathology*, v. 140, p. 769-785, 2014.
- SPECHT, C. A. et al. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.
- TEIXEIRA, J.A.; SILVA, L.L.; CORREIA, H.L.N.; QUEIROZ, M.V. CISge1 is required to whole pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* in Common bean. In: IV Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia, 2018, Viçosa. Anais do IV Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. IV. p. 93, 2018.
- TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, v. 263, n. 1-2, p. 103-112, 2001.
- TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, v. 19, n. 5, p. 517-529, 2005.
- TRAPNELL, C. et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 46-53, 2013.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. SUPPL.2, p. 71–74, 2007.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT – A software to quantify plant disease severity. Depositante: Universidade Federal de Viçosa. Registro de programa de computador: INPI n.º 46096. Depósito: 06 ago. 2002.

WANG, M. et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, v. 2, n. 10, p. 1-10, 2016.

WANG, M. et al. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology*, v. 14, n. 4, p. 421-428, 2017.

WANG, M.; DEAN, R. A. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, n. 4, p. 589-601, 2020.

WENDLAND, A.; LOBO JÚNIOR, M.; DE FARIA, J. C. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. 2018.

WYTINCK, N. et al. Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 12773, 2020.

YAN, K. S. et al. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, v. 426, n. 6965, p. 469-474, 2003.

YANG, J. et al. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *Journal of Advanced Research*, v. 24, p. 317-324, 2020.

YANG, Z. et al. Identification of whole-cell dsRNA-binding proteins by phase separation. *RNA Biology*, v. 21, n. 1, p. 820-833, 2024.

YU, J. et al. Differential contribution of RNA interference components in response to distinct *Fusarium graminearum* virus infections. *Journal of Virology*, v. 92, n. 9, p. e01756-17, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela com os *primers* utilizados

Espécie	Primer	Sequência 5'-3'	Finalidade
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-259-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAGTGCCGACCCTACACCA	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-259-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAACAGCGGAATGGCGTCGA	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-400-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTCATCCGGCATCAAACGT	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-400-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCTTGCCTTCTGTGAC	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-742-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCACAGAAGGCAAGCTCCT	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dsCISGE1-742-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTCTGGTCATCGTCTAGC	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-210-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTGGGCATACGCAGGATG	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-210-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAACGCGAGGAGAAGTACGAC	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-413-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGTTGGCGTTCTCGTAGAC	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-413-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCCGATCCGAGTACATTGG	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-772-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGCCACAGACTCAGCCTT	Síntese dsRNA
<i>C. lindemuhtianum</i>	<i>dspacC-772R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCTTCTCCCTCTTCACGGC	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	<i>dsegfp-215-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTCCAGCAGGACCATGTG	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	<i>dsegfp-215-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCATGGCCGACAAGCAGAA	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	<i>dsegfp-401-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATGCCGAGAGTGATCC	Síntese dsRNA

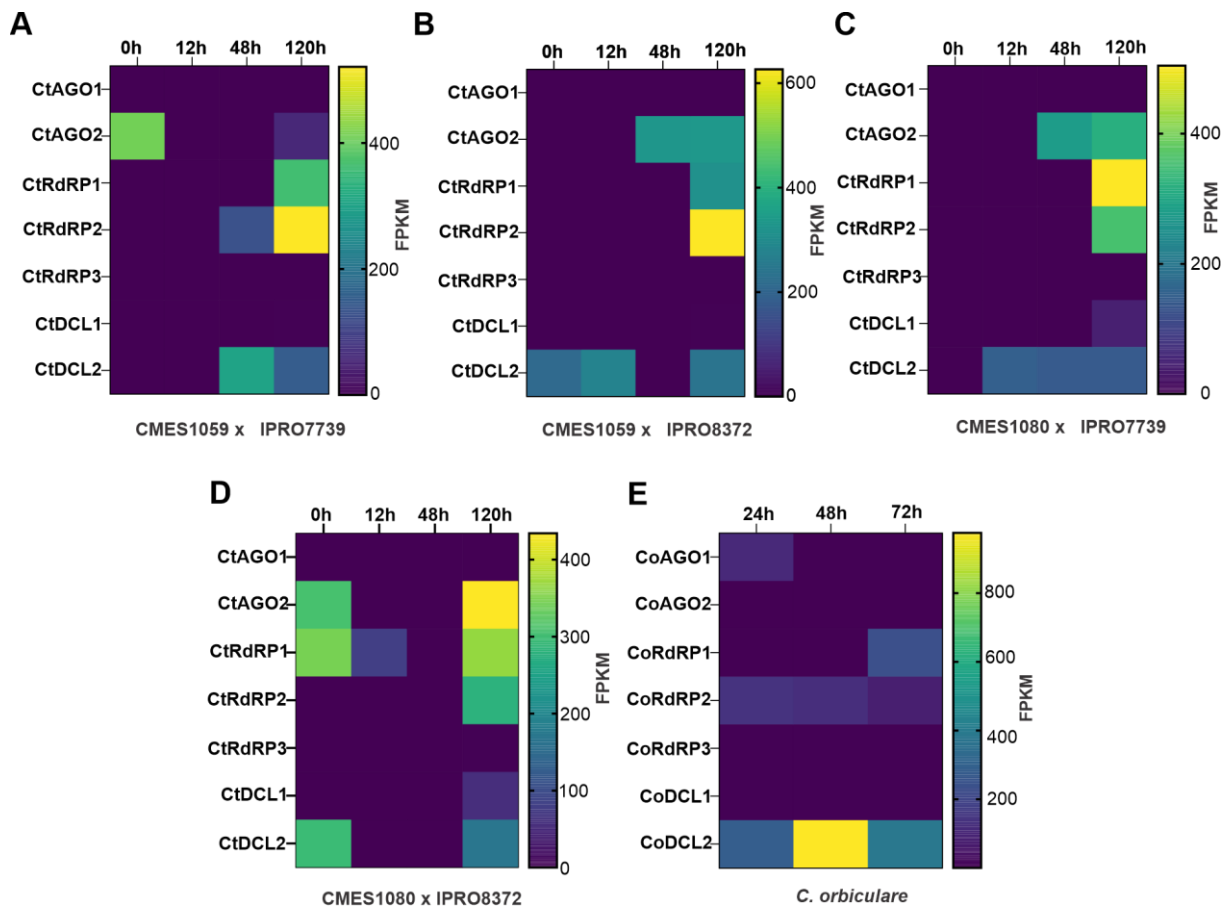
Transformante GFP+	<i>dsegfp-401-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGACGGCAACTACAAG	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	<i>dsegfp-643-F</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATGCCGAGAGTGATCC	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	<i>dsegfp-643-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGACGTAAACGGCCACAAGT	Síntese dsRNA
Transformante GFP+	q2gfp-F	AGAACGGCATCAAGGTGAAC	RT-qPCR
Transformante GFP+	q2gfp-R	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG	RT-qPCR
<i>C. truncatum</i>	CtGAPDH-F	GTACGTGATGGGTGTCAACG	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. truncatum</i>	CtGAPDH-R	CCCTCAACGATGGTGAAGTTG	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. truncatum</i>	Ctrun-ACT-F2	CCTGTTCTTCTGACCGAACC	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. truncatum</i>	Ctrun-ACT-R2	TGACAGCACCGCTTGAATAG	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIAct-F	TGTCTTCGAGACCTTCAACG	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIAct-R	AAGAGCGAAACCCTCGTAAA	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIEF-F	GAGGAGGACGACGACGATGATGT	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIEF-R	TGACGTCCAGGGTGACTACA	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIGAPDH-F	ACCCCTTCATTGAGACCAAG	RT-qPCR (Endógeno)
<i>C. lindemuhtianum</i>	CIGAPDH-R	GGTGGAGTCGTACTTGAGCA	RT-qPCR (Endógeno)

APÊNDICE B – Alinhamento das sequências de CIAGO1 e CIAGO2. **A.** Alinhamento utilizando Clustal W; **B.** Alinhamento utilizando Blast.

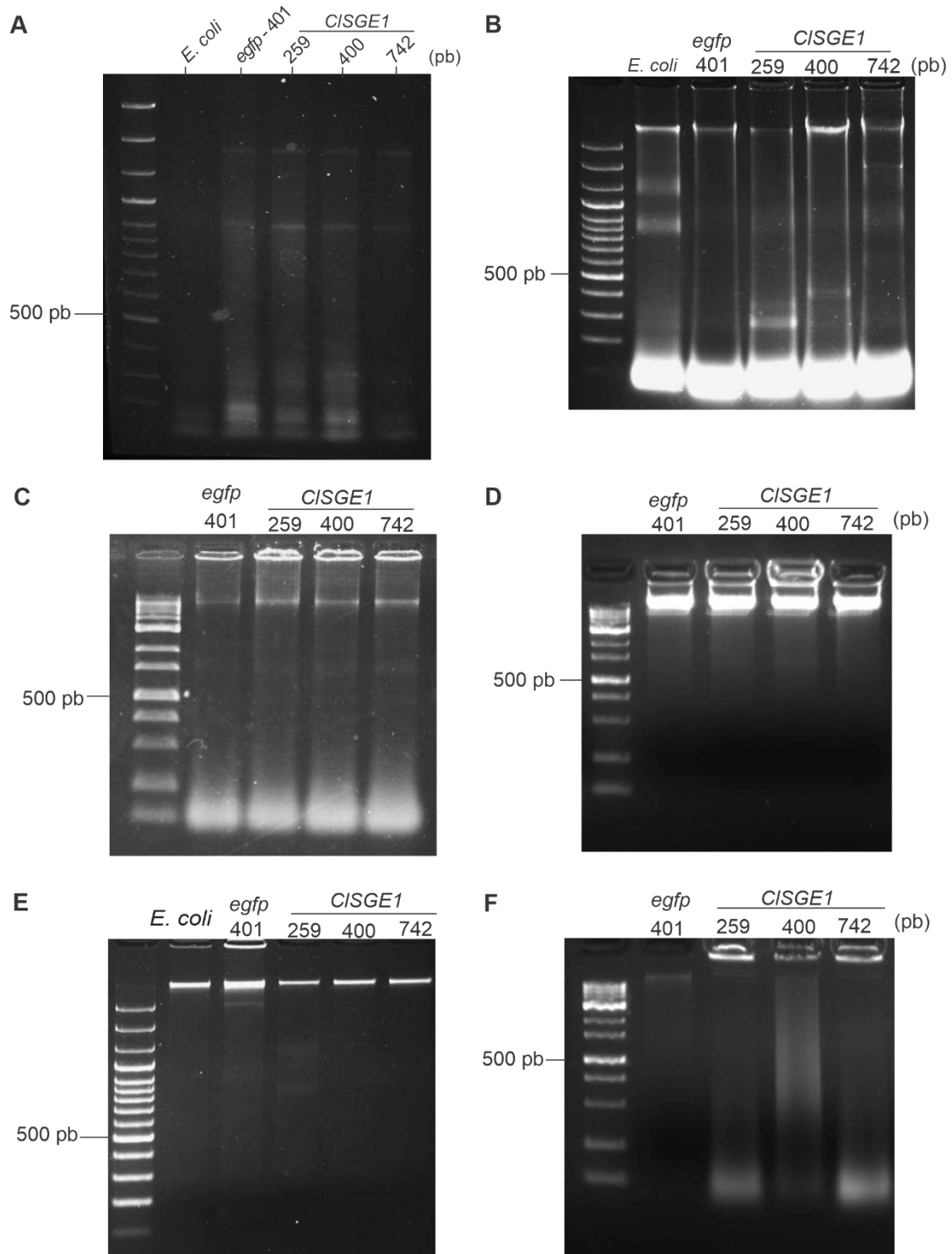
[illegible]

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
222 bits(566)	76-64	Compositional matrix adjust.	166/563(29%)	262/563(46%)	56/563(9%)	
Query 414	PD	-WPLVETQKAG	-FFPMFVKSLSKSHRPFKLDGQQTSMHIGAVTRP	KDRKADI	467	
Sbjct 443	PD +P+V	A P E C + + + Q	KL G +T+ N+ A + P + + +			
	PDARYPVNVIAGSAPRLIPA	EACTITQAGQVRSKL	TGPTETELNFAACRSPFANAVSLV		602	
Query 568	MIUAKSLGKEDPYKQGLV	FDEQPMKIQGLV	DEPPKIEFANYATSPMFAGRMDFRKG		582	
Sbjct 543	+S L G + P + +G+ FDH++	+ G L PP + + + A N + +	+ AG W+ G			
	QOSASALGL-DAPVTQDFGVKFNRL	ITVDGRELPPPTVQYHNRRFAATGASMLNIGV			661	
Query 528	RFFVPIHRQKLSHGI	L I + + + +	-ENRKEAAAGQVQNFQVITSHHGIEIKD	- - - - -	575	
Sbjct 662	KVAKPGPK	ITKWSLRINKNPNTPOSATL	SGPSVTFVQVLTGTPG	- - - - -	717	
	-AVVIDSEARNIMMADAVSKGYG	KIKSATKNTQLPHFCLIRFNIVGVS	IRIKKSADCRFG	+ + +		
Sbjct 718	HKVLNAGSEQLG	LSYLKHTEGLQ	QARGGKNFFLLVLPNTDRLVIGV	KLTDVTFG	777	
Query 635	LITQVLSRINKEQGHQSV	INVMVNAKLG	ETRIANPAGARNLAPAYKEVTHPIGV		694	
Sbjct 778	T CV+ + KN Q + + +	+K N K KG + + P		TH+GG		
	FTJLCVVEKFTKNSQNTA	FIAGLKNKINGNNHVLDPDLOIKSGK	- - - - -	THVVG	831	
Query 695	DVSHAT	-PGI	-EAPSMATHSKSDKDTAYFAA	AVDNTNGVREMLSPNTRNLFLARLHP		750
Sbjct 832	DV+H T P	ADP+ + + S+DKD + A	R EML	T+AF +RL		890
	DVTHPTILNSLDSPSRGVL	LCASVDKMGQNP	AVANEQSRHEMLGDELTKHFRSLR	-	E	
Query 811	NANRKSIRGSGAPPHI	TVFRDGSVQVQVLE	IGAKMKALFQEKYPGAKQKFTVIVAT			818
Sbjct 891	+ S G P +I+ +RDGVS	EGQ VLE E + + + Y K PK +IV+				
	LURKNGSILPENIIVYR	IVDGSSEGFQVLE	LELPLRIKACDQVY	-KKSPPAIIVSV		947
Query 811	KRHHIRFFP	- - - - -	QHKDGENHPLGLTEKECHP	FMDFVLCSHVAIGTARPAPHVYITL		866
Sbjct 948	KRN RF+D	+K N T G + + + +	+HDFeL +H +A+GTARP	HYT+L		1007
	KRHRTFYPTSAAGKSH	IRINGTVDSRGITQARYWDF	LTAHTALGTARPAPHVYTL			
Query 867	MD	- - - - -	AKSPDSQKLMQYQGVQYARS	ITPVS	LHPAIYADLAAGRAHENTIA	918
Sbjct 1008	D+ +L+K+ + CV + R+T	V\$+ P VYAD+ RAR H				
	YDEIFREKYGGAADQLEKL	THDLVCLFGRTAKVSTCPPAYADVYCAERVR	- - - - -			1064
Query 919	TSQGRFG	-PKAAELVDVEGAR	939			
Sbjct 1065	Q F G AA VD G +	-PQHFGDGVSDAASVDITGGV	1086			

APÊNDICE C – *Heatmap* dos perfis de expressão das proteínas-chave da maquinaria de interferência de RNA de espécies de *Colletotrichum* durante a interação com as plantas hospedeiras. **A.** *C. truncatum* CMES1059: interação com soja IPRO7739 (0, 12, 48 e 120 hpi); **B.** *C. truncatum* CMES1059: interação com soja IPRO8372 (0, 12, 48 e 120 hpi); **C.** *C. truncatum* CMES1080: interação com soja IPRO7739 (0, 12, 48 e 120 hpi); **D.** *C. truncatum* CMES1080: interação com soja IPRO8372 (0, 12, 48 e 120 hpi); **E.** *C. orbiculare* MAFF 240422: interação com pepino (24, 48 e 72 hpi). Valores de expressão em FPKM (fragmentos por kilobase de éxon por milhão de fragmentos mapeados).



APÊNDICE D – Testes de extração de dsRNAs a partir de linhagens transformantes de *E. coli* HT115. **A** e **B**. Testes utilizando o protocolo do reagente TRIzol (Invitrogen) em meio de cultivo LB 2 e 1X acrescido de ampicilina, respectivamente. **C**. Teste utilizando o protocolo fenol/clorofórmio. **D**. Teste utilizando a metodologia baseada em sílica (Oliveira et al., 2025). **E**. Teste utilizando o kit RNeasy (Qiagen); **F**. Teste utilizando o protocolo de lise térmica e purificação por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Ahn et al., 2019).



APÊNDICE E – Microcultivo utilizando o isolado de *Colletotrichum truncatum* GFP⁺ para o teste de captação do dsRNA-*egfp* de 401 pb. As setas em amarelo indicam os vacúolos nas hifas.

