

Identificação, caracterização e análise de expressão de genes que codificam peptidil sintases não-ribossomais em *Colletotrichum lindemuthianum*,

Hilberty Lucas Nunes Correia

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

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

T

C824i
2016
Correia, Hilberty Lucas Nunes, 1991-
Identificação, caracterização e análise de expressão de genes que codificam peptidil sintases não-ribossomais em *Colletotrichum lindemuthianum* / Hilberty Lucas Nunes Correia. – Viçosa, MG, 2016.
vi, 43f.: il. (algumas color.).

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2016.
Referências bibliográficas: f.35-43.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. *Colletotrichum lindemuthianum*. 3. Metabolismo secundário. 4. Expressão gênica. 5. Virulência (Microbiologia). 6. Feijão - Doenças e pragas. 7. Antracnose. I. Queiroz, Marisa Viera de, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.4

Hilberty Lucas Nunes Correia

Identificação, caracterização e análise de expressão de genes que codificam peptidil sintases não-ribossomais em *Colletotrichum lindemuthianum*,

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

APROVADO: 23 de Fevereiro de 2016

Mateus Ferreira Santana

Sérgio Herminio Brommonschenkel

Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Após dois anos de lutas intensas e bastante aprendizado profissional e pessoal não deixaria de agradecer àqueles que sempre estiveram ao meu lado.

Primeiramente à Deus, criador do universo, por estar sempre ao meu lado. Assim como o salmista sabiamente escreveu, “Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?” Salmos 116:12.

À meus pais, avó, irmã, tios, tias, primos por todo o apoio e amor a mim dedicados, mesmo à distância sempre dispostos a me escutar e aconselhar.

À meus amigos do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa por toda o apoio, paciência, companhia, gargalhadas e por tudo o mais, sem vocês minha vitória não seria completa.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela orientação, pelos ensinamentos em sala de aula e no laboratório, e pela dedicação durante o período de execução deste trabalho. Muito obrigado pela confiança em mim depositada e por todo o cuidado para com o andamento do trabalho.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, por me co-orientar, pelos ensinamentos em sala de aula e no laboratório e por toda a preocupação e atenção a mim dedicados.

Aos professores Sérgio Herminio Brommonschenkel e Mateus Ferreira Santana por se disponibilizarem a participar da banca de defesa.

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos pela ótima convivência, paciência nos momentos difíceis e pelos preciosos momentos de descontração.

À Casley Queiroz e Mateus Santana por todo o apoio e por todas as sessões de discussão e tira-dúvidas durante o precioso momento do cafezinho.

Ao Pedro Vidigal por toda a colaboração e atenção para com as análises de Bioinformática.

BIOGRAFIA

Hilberty Lucas Nunes Correia , filho de Jonatan Correia da Silva e Auristela Nunes da Silva Correia, nasceu em 14 de Fevereiro de 1991.

Em Fevereiro de 2010, iniciou o curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Alagoas. Foi bolsista de iniciação científica no período de Março de 2011 a Março de 2014. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em Janeiro de 2014.

Em Março de 2014, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
Revisão Bibliográfica	4
O gênero <i>Colletotrichum</i>	4
A Cultura do Feijão e o patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	6
Metabólitos secundários e peptídeos não-ribossomais	9
Material e Métodos	14
Isolados e condições de cultivo	14
Origem das sequências genômicas	14
Predição de genes	15
Identificação e caracterização das NRPSs e dos <i>clusters</i>	15
Análise Filogenética	15
Transcriptomas	16
Análise da Expressão	16
RESULTADOS	17
Identificação de classificação dos <i>clusters</i>	17
Identificação das NRPSs	19
Organização das proteínas	21
Análise filogenética	21
Predição de substratos das NRPSs	22
Análise da expressão	28
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS	35

RESUMO

CORREIA, Hilberty Lucas Nunes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Estudo de NRPSs em *Colletotrichum lindemuthianum*: Identificação, caracterização e análise funcional.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli.

Os fungos em geral, são grandes produtores de metabólitos secundários, que são compostos com funções e estruturas altamente diversas, não requeridos para o crescimento. Dentre os metabólitos secundários destaca-se a classe dos peptídeos não-ribossomais (NRPs), que são polímeros de aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, hidroxilácidos e ácidos carboxílicos. Esta classe de metabólitos é sintetizada pelo mecanismo de auto-molde pela atividade de grandes complexos enzimáticos multidomínios e multimodulares, denominados peptidil sintetases não-ribossomais (NRPSs). Entre as funções de peptídeos não-ribossomais já relatadas estão: imunossupressão, papel de toxinas envolvidas na patogênese, quelação de ferro e etc. O presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação e caracterização das NRPSs em *Colletotrichum* spp. Além disso, foi realizada a análise da expressão dos genes que codificam NRPSs em *Colletotrichum lindemuthianum*, agente etiológico da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram identificados os genes que codificam NRPSs nos genomas de *C. lindemuthianum* (isolados 83, 89 e 7R), *Colletotrichum fioriniae*, *C. glosporioides*, *C. graminicola*, *C. higginsianum* e *C. orbiculare*. O número de genes que codificam NRPSs identificadas variou para cada genoma em questão de 6 a 22. Todos os genes que codificam NRPSs foram encontrados como parte de agrupamentos contendo genes que codificam outras enzimas biossintéticas. A análise filogenética utilizando sequências dos domínios A indicou uma grande diversidade de NRPSs em *Colletotrichum* spp., sendo que algumas destas são ortólogas de proteínas responsáveis pela síntese de produtos relacionados à virulência de fitopatógenos como NPS6 e Hts1. Em *C. lindemuthianum* foram encontradas nove NRPSs, sendo duas destas ortólogas de Hts1 e NPS6. Apenas uma das NRPSs aqui identificadas é específica para a espécie *C. lindemuthianum*. A análise dos transcritos de *C. lindemuthianum* nas diferentes fases de desenvolvimento em plantas de feijoeiro e *in vitro* revelou que todos estes genes são expressos em ao menos uma das fases de desenvolvimento do fungo.

ABSTRACT

CORREIA, Hilberty Lucas Nunes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2016. **NRPSs' study in *Colletotrichum lindemuthianum*: Identification, Characterization and Functional Analysis.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli.

Fungi in general, are major producers of secondary metabolites that are highly diverse in functions and structures, but are not required for growth. Among the secondary metabolites there is the class of non-ribosomal peptides (NRPs), which consist of polymers of proteogenic and non-proteogenic amino acids, hydroxy and carboxylic acids. This class of metabolites is synthesized through the thiotemplate mechanism by large enzyme complex multidomain and multimodulares, called peptidyl synthetase non-ribosomal (NRPSs). This study aimed to carry out the identification, and characterization analysis of NRPSs in *Colletotrichum* spp. In addition, it performed an analysis of the expression of genes encoding NRPSs in *Colletotrichum lindemuthianum*, causal agent of bean (*Phaseolus vulgaris*) anthracnose. The NRPSs have been identified in the genomes of *C. lindemuthianum* (isolates 83, 89 and 7R) *C. fiorinae*, *C. glosporioides* *C. graminicola*, *C. higginsianum* and *C. orbiculare*. The number of identified NRPSs varied from 6 to 22, per genome in question. All NRPSs genes were found as part of clusters containing other biosynthetic enzymes. Phylogenetic analysis indicated a wide range of NRPSs with *Colletotrichum* spp., and some of these are orthologous of proteins responsible for plant pathogens virulence related products production such as NPS6 HTS1. In *Colletotrichum lindemuthianum* was found 9 NRPSs' genes, some of them are orthologous of Hts1 and NPS6. Here was detected the expression of all genes NRPSs at least in one of the development stages evaluated in this study.

INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum*, cuja fase sexual é classificada no Reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes* e família *Glomerellaceae* é composto por aproximadamente 600 espécies, dentre as quais destacam-se mais de 100 como sendo responsáveis pela antracnose e outras doenças em plantas cultivadas (Réblová; Gams; Seifert, 2011). Devido à ubiquidade e ao alto poder de destruição atrelado as suas espécies, este gênero é classificado pela comunidade internacional de fitopatologia como sendo um dos dez gêneros de fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo (Dean et al., 2012).

Os fungos em geral são grandes produtores de metabólitos secundários (SMs), que são compostos não requeridos para o crescimento *in vitro* (Robert et al., 2006). Estes compostos são geralmente bioativos, de baixo peso molecular e possuem estruturas e funções bastante diversificadas, sendo sua grande maioria pertencente às classes dos peptídeos não-ribossomais (NRPs) ou de policetídeos (PKs) (Brakhage, 2013). Os peptídeos não-ribossomais são polímeros de aminoácidos proteinogênicos não-proteinogênicos, e de hidroxíácidos e ácidos carboxílicos. Estes são sintetizados pelo mecanismo de auto-molde pela atividade de grandes complexos enzimáticos multidomínio e multimodulares, denominados peptidil sintetases não-ribossomais (Lee et al., 2005).

Os NRPs possuem atividades biológicas altamente variados, podendo-se citar: antibióticos (penicilina), anticancerígenos (bleomicina), sideróforos (ferricrocina), toxinas (toxina-HC), imunossupressores (ciclosporina) e anti-inflamatórios (Cane et al., 1999). Atualmente, encontram-se disponíveis vários genomas de *Colletotrichum* spp. no banco de dados do NCBI. No entanto, estudos detalhados acerca das NRPSs nesse gênero não existem. O presente trabalho tem como objetivo realizar a identificação, caracterização e análise da expressão das NRPSs em *Colletotrichum* spp., com foco *Colletotrichum lindemuthianum*, agente etiológico da antracnose do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum*, tem sua fase sexual *Glomerella*, classificada no reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Phyllachorales* e família *Phyllachoraceae* (Gautam, 2014). O nome “*Colletotrichum*” foi primeiramente introduzido por Corda em 1831 ao descrever a espécie *C. lineola*. Alguns anos depois Corda (1837, 1840) descreveu duas outras espécies do gênero. Segundo Von Arx (1957), o número de espécies descritas como pertencentes a este gênero cresceu rapidamente, tendo sido relatadas 750 espécies de *Colletotrichum* já em 1957.

Este grande número de espécies segundo Cannon et al. (2012) ocorreu em razão de uma premissa equivocada de que as espécies de *Colletotrichum* possuem uma alta especificidade por seus hospedeiros. Assim, mesmo na ausência de caracteres morfológicos diferenciadores únicos, sempre que um fungo pertencente ao gênero era encontrado em um gênero de plantas diferente, uma nova espécie era considerada. Com o avanço tecnológico outras abordagens passaram a serem utilizadas no ramo da taxonomia de fungos. Sreenivasaprasad et al. (1992) utilizaram pela primeira vez a análise filogenética para a classificação de espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, utilizando a região ITS como marcador molecular. A partir da análise filogenética observou-se que alguns isolados previamente identificados como sendo de espécies diferentes agruparam em conjunto, sendo, portanto, na realidade da mesma espécie.

Com o passar dos anos outros marcadores foram adicionalmente utilizados, fornecendo assim uma melhor resolução taxonômica do gênero (Sherriff et al., 1994; Sreenivasaprasad et al., 1996; Moriwaki et al., 2002; Du et al., 2005). Com a redução dos custos de sequenciamento as análises multilocus tornaram-se mais acessíveis e várias regiões do genoma, tais como as que codificam actina, calmodulina, fator de alongação e RNA polimerase passaram a ser utilizadas em conjunto, sendo esta abordagem nomeada *multi-marker* (Cannon et al., 2012).

A partir destas análises, espécies como *Colletotrichum gloeosporioides*, a qual é encontrada em associação com mais de 470 espécies de plantas, e que anteriormente era descrita como várias espécies individuais, passaram ao nível de complexos de espécies, abrigando assim um conjunto de espécies crípticas (Gan et al., 2013). De acordo com

O'Connell et al. (2012) atualmente são conhecidas 600 espécies de fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. No entanto, segundo Dean et al. (2012) a taxonomia deste gênero permanece ainda como não resolvida, permanecendo num estado de fluxo. Sendo assim, o número de espécies do gênero *Colletotrichum* pode variar de 29 a mais de 700, a depender dos critérios adotados para a classificação.

Dentre as várias espécies de *Colletotrichum* são encontradas saprofitas, endofíticas e fitopatógenos (Centis et al., 1997; Barhoom; Sharon, 2004). De acordo com Gan et al. (2013), o grupo de espécies fitopatogênicas é em grande parte responsável pela importância dada a este gênero. São conhecidas mais de 100 espécies de *Colletotrichum* causadoras da antracnose e outras doenças em diversas culturas, sendo praticamente todas as culturas susceptíveis a pelo menos uma espécie de *Colletotrichum* (Dean et al., 2012; Crouch et al., 2014).

Esta ubiquidade é uma das razões que torna este gênero alvo de estudos relacionados à patogenicidade de fungos (Munch et al., 2008), sendo classificado pela comunidade internacional de fitopatologia como o oitavo gênero de fungos fitopatogênicos mais importante do mundo (Dean et al., 2012).

De acordo com Thrower (1966) os fungos em geral apresentam duas estratégias para a obtenção de nutrientes, a biotrofia, onde os nutrientes são obtidos diretamente das células vivas e a necrotrofia, onde a obtenção de nutrientes se dá a partir de células mortas pelo fungo. A infecção de plantas por *Colletotrichum* spp. inicia-se normalmente pela formação de apressórios melanizados, os quais exercem pressão de turgor sobre o tecido vegetal, permitindo assim a penetração nos tecidos do hospedeiro. Adicionalmente o apressório secreta várias enzimas líticas que auxiliam no processo de penetração (Kleemann et al., 2008; Kubo; Takano, 2013). Após a penetração no hospedeiro, *Colletotrichum* spp. podem seguir duas estratégias de parasitismo. As espécies necrotróficas são normalmente agentes etiológicos de doenças em frutos, sendo incapazes de colonizar o tecido verde (Walker, 1921). Assim, o estabelecimento destas espécies no tecido hospedeiro se dá primariamente por infecções quiescentes, por meio de apressórios não penetrados ou através de micélios subcuticulares, estruturas estas, a partir das quais o fungo pode realizar a transição para a fase necrotrófica, levando à danos significantes e consequente morte do tecido hospedeiro (Prusky, 1996; Liao et al., 2012).

No outro extremo encontram-se as espécies que adotam a hemibiotrofia como estilo de vida. A maioria das espécies de *Colletotrichum* adotam essa estratégia de parasitismo, que segundo Perfect et al. (1999) consiste em uma estratégia de infecção altamente orquestrada compreendendo vários estágios. A hemibiotrofia inicia-se com uma fase biotrófica que pode durar de algumas horas a vários dias de acordo com a espécie (Perfect; Green, 2001), sendo caracterizada pela formação de hifas primárias, bulbosas e irregulares com parede celular separada do citoplasma das células do hospedeiro por meio de uma membrana circundante, derivada do hospedeiro (Vargas et al., 2012).

De acordo com Latunde-Dada (2007) existem três variantes principais de estratégias de colonização adotadas pelas hifas primárias. Na primeira estratégia, adotada por *C. higginsianum* e outros membros do complexo *destructivum* ocorre uma fase biotrófica limitada às células epidérmicas primeiramente infectadas, a qual é seguida de uma mudança completa para a necrotrofia, caracterizada pelo surgimento de hifas finas, necrose e morte do tecido vegetal (O'Connell et al., 2012).

A segunda estratégia, adotada pelas espécies pertencentes ao complexo *orbiculare*, é caracterizada pela persistência da fase biotrófica durante a colonização sequencial das células. Durante esta fase ocorre a morte gradual de células que encontram-se atrás da frente de colonização, sem, contudo, haver uma destruição generalizada. Assim, a infecção torna-se assintomática até o momento em que o fungo passa para a fase necrotrófica (O'Connell et al., 2000).

A terceira estratégia é adotada por membros do complexo *graminicola*. Neste caso, os acontecimentos são similares ao que ocorre com membros do complexo *orbiculare*. No entanto, nestas espécies ocorre a formação de hifas secundárias, responsáveis pela fase necrotrófica a partir das hifas primárias nas células atrás da frente de colonização. Assim, a fase biotrófica existe concomitantemente com a fase necrotrófica (Mims; Vaillancourt, 2002; Wharton; Julian, 1996; Wharton et al., 2001).

A Cultura do Feijão e o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, e é a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus* no mundo, apresentando-se como uma cultura de alta importância mundial, tanto no cenário socioeconômico, quanto no ramo da nutrição. Segundo Medeiros (2004), o feijão é originário do Continente Americano e o seu cultivo é altamente disseminado, podendo-se dizer que sua produção ocorre em praticamente todo o mundo.

Segundo a FAO (2015), atualmente o continente asiático é responsável pela maior parte da produção de feijão no mundo (44,6% do total), sendo seguido pelas Américas (31,1%) e África (21,8%). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, tendo produzido no ano de 2013 um total de 2.892,599 de toneladas, sendo ultrapassado apenas pela Índia (3.630,000) e por Mianmar (3.700,000) (FAO, 2015). No Brasil a produção de feijão ocorre na maioria dos estados, sendo as regiões Sul e Sudeste destaques nacionais na produção do grão, seguidas pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte (Embrapa Arroz e Feijão, 2012).

Por ser uma planta de ciclo curto, a cultura do feijão propicia aos produtores a oportunidade de obter mais de uma colheita por ano, o que favorece a um melhor aproveitamento da terra e ao aumento da produção do grão. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2014), o estado do Paraná é o maior produtor nacional de feijão, tendo produzido na safra 2009/2010 298 mil toneladas do grão. No mesmo período, o estado de Minas Gerais ocupou o segundo lugar, e produziu 214 mil toneladas, sendo seguido pelos estados da Bahia, São Paulo e Goiás.

Segundo Jones (1999), dentre as leguminosas o feijão é o alimento mais importante para o consumo direto no mundo, o que se deve, sobretudo as suas características nutricionais como seu alto teor proteico, que pode chegar a 33% e o bom conteúdo de carboidratos, fibras, vitaminas e minerais. Além disto, em sua composição o feijão apresenta compostos fenólicos que possuem ação antioxidante, os quais podem contribuir para a prevenção de doenças (Bonett; Klein, 2007).

Dentre os problemas que afetam a cultura do feijão estão as doenças, que podem diminuir drasticamente sua produtividade, causando prejuízos econômicos. Segundo Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI (2012) existem mais de 200 doenças que afetam a cultura do feijão, dentre as quais se destacam as doenças fúngicas. O controle de doenças é um dos principais fatores que são responsáveis pela elevação do custo de produção do feijão. De acordo com Schwartz (1980), os gastos com o controle químico de doenças nas lavouras são bastantes elevados, onerando os custos da produção.

Dentre as doenças causadas por fungos que ocorrem na cultura do feijão destaca-se a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams.-Scrib. em sua fase anamórfica. Além da cultura *Phaseolus vulgaris*, o patógeno *C. lindemuthianum* também é causador de doenças em outras leguminosas como *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (Zaumeier; Thomas, 1957).

Os sintomas da antracnose podem ocorrer em todos os órgãos aéreos da planta. Nas sementes, os sintomas são lesões levemente deprimidas de coloração marrom com bordos escuros, que são bem evidentes nas sementes que possuem o tegumento de coloração clara. Nas vagens são encontradas as lesões mais características desta doença, sendo arredondadas, deprimidas e possuindo coloração escura. Quando as condições de umidade e temperatura são adequadas forma-se uma massa rósea de esporos. As lesões podem ainda ocorrer em cotilédones, nas nervuras das folhas, nos caules e no pecíolo (Zaumeier; Thomas, 1957).

Segundo Schwartz (1980), a antracnose é prevalecente principalmente em regiões onde as temperaturas são geralmente de moderadas a frias, isto associado à alta umidade relativa do ar. Segundo a EPAGRI (2012), as perdas na produção devido à ocorrência de doenças são geralmente altas, levando frequentemente a reduções de mais de 50%. Além disto, quando sob condições favoráveis, as perdas na produção podem atingir 100%. De acordo com Costa (2002), *C. lindemuthianum* sobrevive entre as estações de cultivo do feijoeiro na forma de micélio dormente em sementes infectadas, nos cotilédones sob a forma de esporos e nos restos culturais na forma de micélio ou acérvulos, dificultando assim seu controle.

O primeiro genoma de fungo fitopatogênico sequenciado foi o de *Magnaporthe oryzae* no ano de 2005 (DEAN et al., 2005). Ao longo do tempo as tecnologias de sequenciamento tornaram-se mais rápidas e baratas, o que possibilitou a geração das sequências genômicas de vários outros micro-organismos. Até o fim do ano de 2012, mais de 30 genomas de fungos fitopatogênicos tinham sido sequenciados (RAFFAELE; KAMOUN, 2012). Atualmente vários genomas de espécies do gênero *Colletotrichum* encontram-se disponíveis, dentre elas: *C. higginsianum*, *C. graminicola*, *C. falcatum*, *C. orbiculare* e *C. glosporioides*, *C. sublineola*, *C. acutatum* (O'Connell et al., 2012; Gan et al., 2013; Baroncelli et al., 2014).

Metabólitos secundários e peptídeos não-ribossomais

Os micro-organismos produzem uma grande quantidade de metabólitos denominados secundários (SMs), os quais são diferenciados dos metabólitos primários por não estarem ligados diretamente a processos indispensáveis à vida, não sendo portanto requeridos ao crescimento *in vitro* (Keller; Turner; Bennett, 2005). Tais compostos são geralmente bioativos, de baixo peso molecular e possuem estruturas e funções bastante diversas, sendo em sua maioria derivados de peptídeos não-ribossomais (NRPs) ou de policetídeos (Brakhage, 2013).

Dentre os metabólitos secundários microbianos podemos citar: antibióticos (penicilina, vancomicina), anticancerígenos (bleomicina), sideróforos (enterobactina), toxinas (cianotoxinas), surfactantes, imunossupressores e anti-inflamatórios (Cane, 1999). Estes, apresentam-se como uma importante fonte de novas entidades químicas, correspondendo a mais de 40% das novas drogas reportadas entre os anos de 1981 a 2004 (Clardy; Walsh, 2004). Geralmente os genes responsáveis pela biossíntese de SMs são localizados em agrupamentos (*clusters*), os quais podem conter mais de 10.000 bases (Smith, 1990; Trail et al., 1995). A grande maioria destes clusters possuem um ou vários genes biossintéticos que codificam enzimas extremamente grandes, como peptidil sintetases não-ribossomais (NRPSs) ou policetídeo sintetases (PKSs) (Hertweck, 2009). Tais enzimas apesar de possuírem arquiteturas e mecanismos biossintéticos similares, diferem consideravelmente quanto ao substrato utilizado. Segundo Brakhage e Schroeckh (2011), as NRPSs utilizam aminoácidos como blocos estruturais, enquanto as PKS utilizam malonil.

Os peptídeos não-ribossomais (NRPs) são sintetizados pelas peptidil sintetases não-ribossomais (NRPSs) (Sieber; Marahiel, 2005), e consistem em uma família de produtos naturais estruturalmente diversos que demonstram uma larga variedade de atividades biológicas (Eisfeld, 2009). Além dos aminoácidos proteínogênicos, os NRPs são também frequentemente derivados de aminoácidos não proteínogênicos, hidroxiácidos e ácidos carboxílicos (Keller et al., 2005; Cane et al., 1999). Em todos os casos conhecidos os genes que codificam NRPSs são encontrados como sendo parte de *clusters* contendo genes que codificam, além da NRPS, outras enzimas biossintéticas (Brakhage; Schroeckh, 2011). Além disso, sabe-se que tanto a expressão dos *clusters* de NRPSs, quanto a ativação da produção de NRPs são sujeitas à regulação global e a ativação local (Stack et al., 2007).

As NRPSs consistem em grandes enzimas multidomínio, multimodulares que estão entre as maiores enzimas conhecidas na natureza, possuindo massas atômicas de 100-1700 kDa (Marahiel et al., 1997; Oide et al., 2006; Tadbadou, 2014). Conforme Eisfeld (2009) por meio de análises bioquímicas foi descoberto que estas enzimas são formadas por uma cadeia polipeptídica simples que contém todas as funções catalíticas necessárias para a síntese de peptídeos, que são: (i) ativação do substrato, (ii) tiolação, (iii) N-metilação e (iv) condensação. A **Figura 1** apresenta a estrutura típica de uma NRPS de fungos. Um módulo de NRPS contém vários domínios, cada um com sua função específica, os quais em conjunto são responsáveis pela adição de um aminoácido à cadeia polipeptídica crescente (Challis, 2000).

Segundo Cramer et al. (2006), cada módulo contém no mínimo três domínios, que são: domínio A (responsável pela seleção e ativação do aminoácido a ser adicionado ao peptídeo); domínio T ou PCP (que liga o substrato covalentemente a enzima através de uma ligação tioéster); domínio C (responsável por catalisar a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos). Além destes domínios, uma variedade de domínios opcionais, como os domínios de epimerização (E) e metiltransferase (MT) podem estar presentes (Clardy; Walsh, 2004).

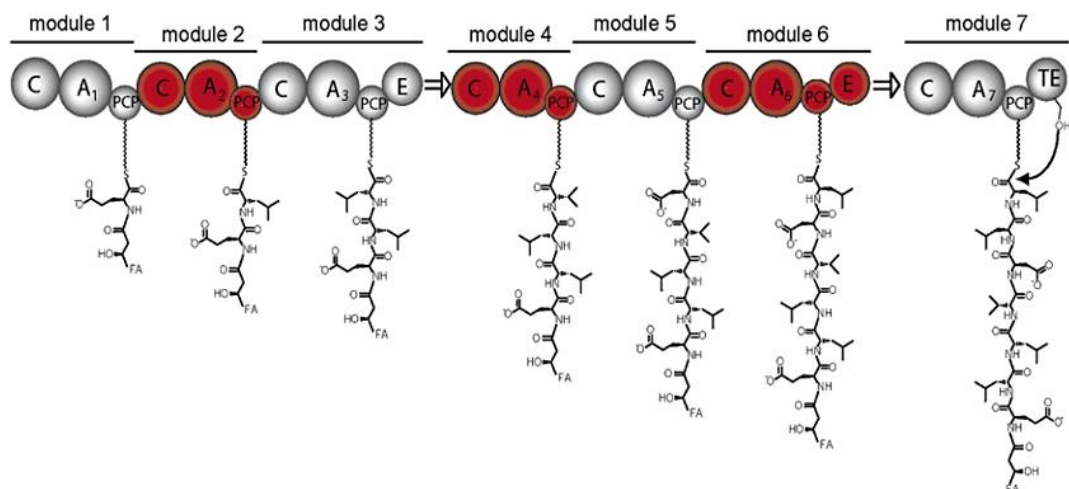


Figura 1. Organização típica de NRPSs em fungos (Sieber; Marahiel, 2008).

Segundo Schwecke et al. (2006), apesar do fato da arquitetura das enzimas serem semelhantes, existem diferenças notáveis entre NRPSs em fungos e bactérias. A primeira diferença seria que o “código não-ribossomal” aplicado as bactérias não pode ser aplicado para fungos devido ao fato do mesmo diferir entre tais organismos. Outra diferença é que a maior parte das NRPSs de fungos consiste em uma única cadeia polipeptídica, enquanto que em bactérias, na maioria dos casos são constituídas por mais de uma proteína (Weber et al., 1994). Além disto, a maioria das NRPSs de bactérias possuem o domínio tioesterase redutase que é responsável pela liberação do peptídeo na região C-terminal; já no caso de fungos, este domínio é raramente relatado (Keating et al., 2001).

Nos últimos anos, como consequência da maior disponibilidade das sequências genômicas, alguns estudos mais detalhados têm revelado a presença e buscado a elucidação da função dos NRPs em fungos. Embora a presença e a atividade de NRPs com respeito à interação com outros organismos estejam sendo estudadas há vários anos, a função e significância fisiológica de sua grande maioria permanecem desconhecidas (Gillian Turgeon; Oide; Bushley, 2008). Dentre as funções até então relatadas podemos citar o papel no desenvolvimento reprodutivo, na regulação da morfologia, nas propriedades da superfície celular, na resistência ao estresse e na captação de nutrientes, patogenicidade e adaptação ambiental (Oide et al., 2006).

Tsunawaki et al. (2004) estudaram a função de NRPs em *Aspergillus fumigatus*, e demonstraram que um NRP secretado por este fungo é capaz de bloquear especificamente a explosão oxidativa em humanos por meio da inibição da montagem da NADPH oxidase. Lee et al. (2005) em estudo conduzido na Califórnia realizaram a identificação e a análise funcional de NRPSs presentes em *Cochiobolus heterostrophus*, agente etiológico da mancha foliar no milho. Foram identificados 11 genes que codificam NRPSs, além de dois pseudo-genes. Por meio da inativação do gene *NPS6* foi verificado que o mesmo é requerido para a virulência do fungo, além de também desempenhar papel na resistência ao estresse oxidativo. Os autores também demonstraram que a aplicação de ferro era capaz de restaurar a virulência do mutante, indicando que este gene codifica um sideróforo.

Ainda segundo Lee et al. (2005), o gene *NPS6* é o único desta classe que possui ortólogos em vários outros ascomicetos examinados. Por meio da análise do genoma, Turgeon et al. (2008) identificaram 12 genes de NRPSs em um isolado de *C. heterostrophus*, quatro dos quais são conservados em espécies de ascomicetos, enquanto oito são distribuídos descontinuamente. A função dos genes foi estudada por meio de mutação sítio direcionada e após a análise dos mutantes, os fenótipos observados foram: alteração na morfologia das colônias; redução da esporulação assexuada; redução do desenvolvimento sexual; e hipersensibilidade a várias formas de estresse.

Em trabalho realizado por Tobiasen et al. (2007) em *Fusarium graminearum*, foram identificados 15 genes de NRPSs. Os maiores genes identificados consistem de domínios compondo um módulo mínimo e domínios C funcionais. Enquanto isto, os pequenos genes de NRPSs identificados contém domínios mais diversos, sendo que em alguns dos menores notou-se a ausência de domínios C. Não foram encontrados íntrons em qualquer dos genes NRPSs identificados. Os genes foram mutados através da substituição mediada por *A. tumefaciens* e na análise dos mutantes encontrou-se que o gene *NPS2* é responsável pela síntese de um sideróforo intracelular denominado ferrirocina.

Segundo O'Connell et al. (2012) foram encontrados genes de NRPSs nos genomas de *C. higginsianum*, *C. graminicola* e *C. orbiculare*, sendo que o número destes genes variou para cada espécie. Gan et al (2013) em seu estudo de genômica comparativa de *C. orbiculare* identificaram os genes de NRPSs presentes neste fungo. O número de genes encontrado foi o de 11 genes NRPSs e 9 genes NRPSs-like, além de 3 NRPS-PKS híbridas.

De acordo com os dados publicados por Gan et al. (2013), genes de NRPSs foram encontrados no genoma de vários fungos, sendo que o número varia significativamente para cada espécie em questão. Os números obtidos para algumas espécies já estudadas são: *Aspergillus nidulans* (11 NRPS, 12 NRPS-like); *Neurospora crassa* (3 NRPS, 0 NRPS-like); *Magnaporthe oryzae* (5 NRPS, 6 NRPS-like); *Fusarium graminearum* (10 NRPS, 11 NRPS-like); *Ustilago maydis* (3 NRPS, 6 NRPS-like); *C. graminicola* (7 NRPS); *C. higginsianum* (12 NRPS); *C. gloeosporioides* (14 NRPS, 10 NRPS-like); e *C. orbiculare* (11 NRPS, 9 NRPS-like).

O sequenciamento do genoma de *Fusarium graminearum* revelou a presença de 19 genes de NRPS (Hansen et al., 2012a). Posteriormente, Hansen et al. (2012b) utilizaram mutantes com deleção e apresentando superexpressão do gene NRPS4 para investigar sua função e a de seu produto. Os mutantes foram analisados e revelaram que a deleção do gene da NRPS4 leva a uma diminuição da hidrofobicidade, enquanto que a superexpressão leva ao aumento da hidrofobicidade da superfície. Estas observações sugerem que o peptídeo produto da NRPS4 pode ser um fator regulador da arquitetura das paredes celulares ou um regulador indireto da hidrofobicidade.

Hansen et al. (2015) realizaram em seu estudo uma análise comparativa de NRPSs em dez espécies diferentes de fungos do gênero *Fusarium*, o que resultou na identificação 52 grupos de ortologia de NRPSs. Dos genes de NRPSs identificados neste estudo seis estão presentes em todos os isolados estudados (NRPS 2, 3, 6, 10, 11 e 12) e um (NRPS4) está presente em todos os isolados, exceto no isolado de *Fusarium oxysporum* (Fo5176), indicando assim que estão envolvidos na biossíntese de produtos importantes para os fungos. Como exemplo, NRPS 2 e 6 já foram relatados como sendo envolvidos com a síntese dos sideróforos ferricrocina e fusarinina (Tobiasen et al., 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados e condições de cultivo

Os isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* usados neste trabalho foram: 83.501 (raça 83), isolado 89_{A2} 2-3 (raça 89) e o isolado 7R, ainda sem raça definida, sendo todos pertencentes à coleção de fitopatógenos do Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa. Para a produção dos inóculos, os fungos foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA). Em todas as análises do presente trabalho, os isolados foram incubados em câmara de crescimento a 22°C ± 2, sob fotoperíodo de 12 horas. Para a produção de esporos discos de micélio de 5 mm dos fungos crescidos em meio BDA durante sete dias foram depositados na superfície de vagens de feijoeiro-comum, previamente autoclavadas, acondicionadas em tubos de ensaio e as condições de incubação consistiram nas mesmas previamente citadas. Incubou-se por 10 dias e após este período foi obtida uma suspensão de esporos adicionando-se 2 mL de água destilada autoclavada em cada tubo e agitando brevemente.

Origem das sequências genômicas

No trabalho presente foram utilizados três genomas de *Colletotrichum lindemuthianum* (isolados 83, 89 e 7R) sequenciados em plataforma Illumina HiSeq 2500 a uma cobertura de 50x. Os genomas dos isolados 83 e 89 foram montados utilizando-se os softwares Velvet (Zerbino; Birney, 2008) e SSPACE 2 (Boetzer et al., 2010) pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LACTAD). O genoma do isolado 7R foi montado utilizando-se o software CLC Genomics Workbench. Estes genomas pertencem ao banco de dados de sequências do Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa. Também foram utilizados os proteomas de *C. fioriniae* (NCBI Bioproject PRJNA244481), *C. gloesporioides* (NCBI Bioproject PRJNA225509) *C. graminicola* (NCBI Bioproject PRJNA225514), *C. higginsianum* (NCBI Bioproject PRJNA47061) e *C. orbiculare* (NCBI Bioproject PRJNA171217) para análises complementares.

Predição de genes

Para a predição dos genes e obtenção das sequências protéicas nos genomas de *C. lindemuthianum* foi empregado o software Augustus (Stanke et al., 2008), configurado para *C. orbiculare*, configurado para buscar somente genes completos e todos os demais parâmetros configurados conforme o padrão do programa.

Identificação e caracterização das NRPSs e dos clusters

A primeira etapa da identificação das proteínas foi a criação de um banco de NRPSs obtidas no UniProt. Onde, sequências obtidas diretamente do site foram utilizadas para a criação do banco de dados, utilizando um script escrito em linguagem Python[®]. Posteriormente, foi realizado um alinhamento local de proteínas (blastp) com valor de corte de 10^{-5} , utilizando o proteoma de cada isolado de *Colletotrichum* spp. como consulta contra este banco de dados previamente criado. Sequências com identidade inferior a 30% foram descartadas e os remanescentes tiveram seus domínios conservados identificados por meio da ferramenta CDD (*Conserved Domain Database*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.html>). A análise empregando o programa blastp foi realizada em ambiente Linux utilizando-se a ferramenta ncbi-blast+. Proteínas contendo ao menos um módulo essencial completo (contendo os domínios A, T e C) foram anotadas como NRPS, enquanto aquelas apresentando a ausência de um destes domínios foram consideradas NRPS-like. A detecção dos clusters de genes de metabolismo secundário foi realizada utilizando o software antiSMASH *database* (Marnix et al., 2011).

Análise Filogenética

Para o estudo filogenético das NRPSs ao longo do gênero *Colletotrichum*, as sequências dos domínios A das NRPS identificadas foram extraídas com o auxílio do software UGENE (Okonechnikov, K. et al., 2012). As sequências foram alinhadas com o ClustalW e a matriz Blosum de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos, utilizando o software Mega 6.0 (Tamura, K. et al., 2013). O alinhamento foi editado utilizando o software Gblocks (Talavera; Castresana, 2007). Sequências com menos de 200 aminoácidos foram descartadas, e a significância da árvore foi acessada pelo método de

Bootstrap (Felsenstein, 1985) com 4000 repetições. Ao alinhamento foram adicionadas sequências de domínios A de NRPSs com funções relatadas. A árvore foi gerada pelo método de *neighbor-joining* (Saitou; Nei, 1987).

Transcriptomas

Para a extração do RNA a ser utilizado no sequenciamento, uma suspensão de esporos de *C. lindemuthianum* (isolado 7R) a 10^6 conídios. ml⁻¹ foi borrifada até o ponto de molhagem completa de folhas de plantas de feijoeiro var. rosinha, 10 dias após a emergência. As plantas foram incubadas a 22 °C ± 2, sob fotoperíodo de 12 horas e em condições de câmara úmida e as coletas foram realizadas 18 horas após a inoculação (Hpi) (fase apressorial), 48 Hpi (fase biotrófica) e 120 Hpi (fase necrotrófica), utilizando-se nitrogênio líquido, sendo as amostras acondicionadas a - 80°C até a data da extração do RNA. Para a simulação da fase vegetativa o fungo foi cultivado em meio GPYECH (Parisot et al., 2002) durante 5 dias e seguiu-se com a extração do RNA. A extração do RNA foi realizada utilizando-se o Kit Nucleo-Spin RNA Plant (*Macherey-Nagel*). Os transcriptomas foram sequenciados em plataforma Illumina HiSeq 2500 com PE de 2x150pb pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD/Unicamp).

Análise da Expressão

O *report* de qualidade das *reads* sequenciadas foi realizado utilizando o software FastQC (Andrews, 2010) e para a trimagem foi utilizado o software Trimmomatic Bolger; Lohse; Usadel, 2014). Posteriormente, as *reads* foram mapeadas ao genes preditos do isolado, utilizando o software Bowtie2 (Langmead et al., 2009). As análises posteriores para identificar os genes diferencialmente expressos foram realizadas utilizando o software R, versão 3.1.2 (R Core Team, 2013). Primeiramente, as contagens de reads foram ajustadas utilizando o método de normalização TMM do pacote edgeR, versão 3.8.5 (Robinson et al., 2010). Posteriormente os genes diferencialmente expressos foram detectados utilizando o método “MARS”, do pacote DEGseq, versão 3.0 (Wang et. al, 2010).

RESULTADOS

Identificação e classificação dos clusters de genes de metabolismo secundário

Os *clusters* dos genes relacionados ao metabolismo secundário foram identificados nas diferentes espécies de *Colletotrichum* pela análise do proteoma predito de cada isolado. O número total de *clusters* relacionados ao metabolismo secundário encontrados variou de acordo com os genomas de 42 a 81. Em *Colletotrichum lindemuthianum* foram encontradas 42 (isolado 7R) e 46 *clusters* (isolados 83 e 89). Foram encontrados dez *clusters* de NRPSs no genoma de *C. lindemuthianum* (isolados 83 e 89), oito em *C. lindemuthianum* (isolado 7R), doze em *C. gloesporioides*, vinte em *C. higginsianum*, cinco em *C. graminicola* e *C. fioriniae* e onze em *C. orbiculare* (**Figura 3**). Cem por cento (100%) dos genes que codificam NRPSs foram encontrados em *clusters* de metabolismo secundário.

Todas os genes que codificam peptidil sintetases não-ribossomais aqui identificados estão presentes em *clusters* de metabolismo secundário. Destes, 93% estão em *clusters* que contém além do gene do gene NRPS um ou mais genes que codificam outra enzima biossintética relacionada ao metabolismo secundário, 50% dos quais estão em *clusters* contendo três ou mais outras enzimas biossintéticas, tais como PKSs e TPSs. Foram encontrados genes que codificam proteínas regulatórias em somente 10% dos *clusters*, sendo que em nenhum destes foi encontrado mais de um gene regulatório. Oitenta e um por cento dos *clusters* de NRPSs em *Colletotrichum* spp. contem proteínas relacionadas ao transporte. A **Figura 4** apresenta um resumo da caracterização dos *clusters* contendo NRPSs nos proteomas de *Colletotrichum* spp.

Para melhor caracterizar as proteínas previamente classificadas como “relacionadas ao transporte” pelo antiSmash, foi utilizada a ferramenta CDD do NCBI. Das proteínas relacionadas ao transporte presentes nos *clusters* de NRPSs 62% foram classificadas como transportadores MFS 23% transportadores ABC. As proteínas classificadas na classe “outros” pelo antiSmash foram submetidas a uma anotação funcional utilizando-se a categoria Processos Biológicos do Gene Ontology pelo software Blast2GO.

Dentro da categoria de Processos Biológicos do Gene Ontology estas proteínas foram então associadas com: organização de componentes celulares; processos metabólicos celulares; processos metabólicos primários; estabelecimento de localização; biogênese de componentes celulares; processos biossintéticos; localização individual; processos metabólicos de compostos nitrogenados; processos celulares individuais; resposta celular a estímulos; processos metabólicos individuais; processos metabólicos de compostos orgânicos; regulação de processos biológicos e outros (**Figura 5**).

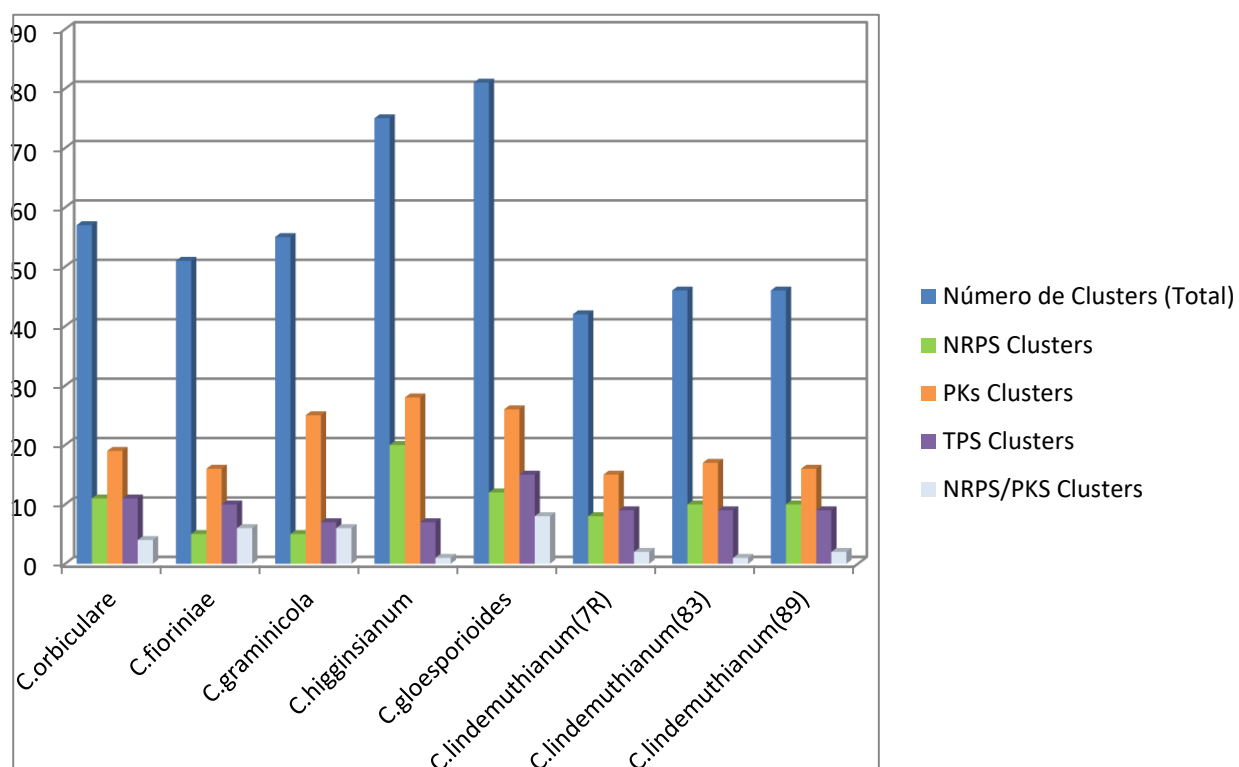


Figura 3. Número e classificação dos *clusters* de peptidil sintetases não-ribossomais (NRPSs), policetídeo sintases (PKs), terpeno sintases (TPS), peptidil-policetídeos sintases híbridas (NRPS/PKS) e número total de *clusters* por proteoma encontrados nos proteomas preditos de *Colletotrichum* spp, utilizando a ferramenta antiSmash *database* (Marnix et al., 2011).

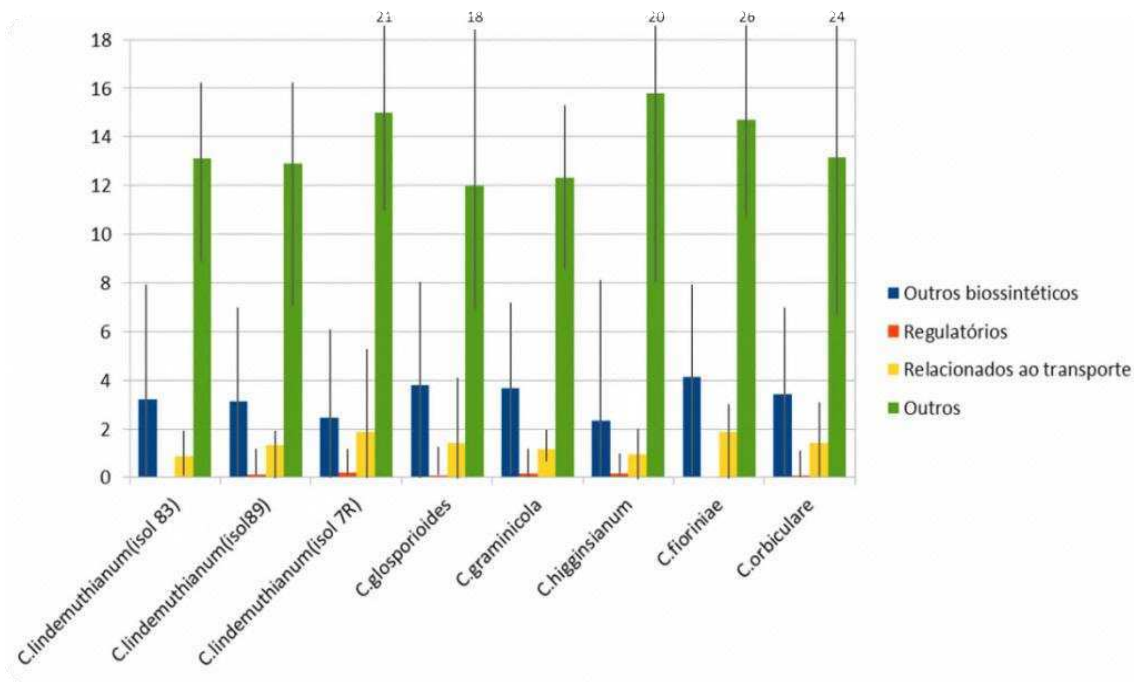


Figura 4. Composição dos *clusters* contendo genes que codificam NRPSs em *Colletotrichum* spp. As colunas consistem em valores médios. As linhas verticais representam a variação (menores apresentam maior valores).

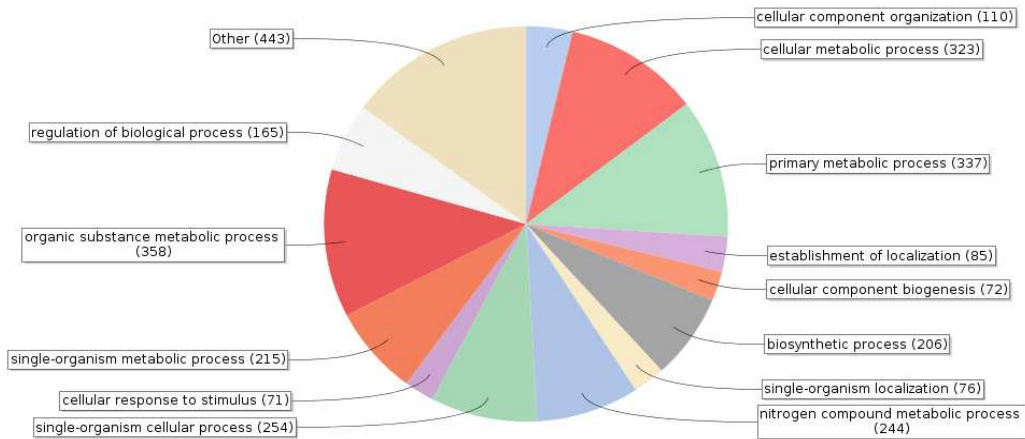


Figura 5. Anotação Funcional das proteínas codificadas por genes presentes em *clusters* de peptidil sintetases não-ribossomais previamente classificadas como “outros” pelo antiSmash. A classificação foi feita por meio da Categoria “Processos Biológicos” do Gene Ontology.

Identificação dos genes de NRPSs

Para a identificação das NRPS nos genomas de *Colletotrichum* spp. foi realizado um blastp utilizando o proteoma predito de cada isolado como consulta contra um banco de dados de NRPS previamente criado. Foram consideradas NRPS apenas as proteínas contendo ao menos um módulo essencial completo. O número de genes que codificam NRPSs variou para cada genoma em questão. Utilizando-se da nossa proposta metodológica identificamos 9 NRPS em *C. lindemuthianum* (isolados 83, 89 e 7R), 7 NRPSs no proteoma de *C. fioriniae*, 15 NRPSs em *C. gloesporioides*, seis em *C. graminicola*, 22 em *C. higginsianum* e 12 em *C. orbiculare*. O tamanho dos genes de NRPS em *C. lindemuthianum* variou de 7215 a 14870 pb no isolado 83, de 5890 a 14879 pb no isolado 89 e de 5037 a 14870 pb no isolado 7R. Foram encontrados íntrons em todos os genes NRPS dos três isolados de *C. lindemuthianum*, com exceção do gene *NPS4* (isolado 7R). O número de íntrons por gene variou de um a oito no isolado 83, de um a seis no isolado 89 e de zero a sete no isolado 7R. O número de NRPS e NRPS-like encontrados em cada proteoma encontra-se apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Número de NRPSs e NRPSs-like identificados nos genomas de *Colletotrichum* spp.

Isolado	NRPSs	NRPSs-like
<i>C. lindemuthianum</i> (83)	9	4
<i>C. lindemuthianum</i> (89)	9	3
<i>C. lindemuthianum</i> (7R)	9	8
<i>C. fioriniae</i>	7	7
<i>C. gloesporioides</i>	15	5
<i>C. graminicola</i>	6	8
<i>C. higginsianum</i>	22	7
<i>C. orbiculare</i>	12	7

Organização das proteínas

Utilizando as sequências proteicas preditas das peptidil sintetases não-ribossomais de *Colletotrichum* spp. foi realizada a identificação dos domínios conservados. Cada padrão de organização modular encontrado foi anotado e identificado com um código individual. Foram encontradas proteínas contendo de um a sete módulos completos, e por meio da caracterização organizacional das proteínas foram formados sete sub grupos de NRPSs. O grupo *a* corresponde a 9 % das proteínas aqui identificadas, e é caracterizado pelas NRPSs trimodulares e tetramodulares que contêm apenas os domínios essenciais. Trinta e cinco por cento (35%) das NRPSs de *Colletotrichum* spp apresentam a organização do grupo *b*, as quais são bimodulares ou monomodulares, compostas por apenas domínios essenciais. O grupo *c* contém as NRPSs contendo o domínio tioesterase reductase e engloba 30% das NRPSs identificadas no presente trabalho. No grupo *d* foram agrupadas as proteínas contendo o domínio Hx (14,6%), enquanto no grupo *e* (17,97%) foram classificadas as proteínas contendo o domínio N. No grupo *f* (2,24 %) foram classificadas as NRPSs contendo domínios metil transferase, e no domínio *g* (1%) foram classificadas as proteínas contendo o domínio de epimerização. Os padrões observados encontram-se apresentados na **Figura 6**. Adicionalmente, foi construído um dendrograma a partir do padrão de distribuição das diferentes organizações de NRPSs ao longo das espécies de *Colletotrichum*. Adicionalmente, foi construído um dendrograma (**Figura 7**) a partir do padrão de distribuição das diferentes organizações de NRPSs ao longo das espécies de *Colletotrichum*. O dendrograma indica que o padrão de distribuição das NRPSs não coincide com a distribuição filogenética das espécies. Por exemplo, *C. lindemuthianum* (7R) aparece como sendo mais proximamente relacionado à *C. graminicola* e à *C. orbiculare* que aos outros isolados de *C. lindemuthianum* (83 e 89). Além disto, *C. graminicola* agrupou entre *C. lindemuthianum* (7R) e *C. orbiculare*, sendo estes pertencem a complexos de espécies distintos na análise filogenética.

Análise filogenética

Para identificar ortólogos a análise filogenética de NRPSs ao longo do gênero *Colletotrichum* foi realizada utilizando as sequências de domínios A, que são os mais

conservados entre todos os domínios encontrados nestas proteínas. Um total de 181 sequências de aminoácidos de domínios. Ao alinhamento foram adicionadas sequências de domínios A de acetil-coA ligases, cumarato/acetil-coA ligases e acetil-coA sintetases como grupos externos. A árvore parcial encontra-se apresentada na **Figura 9**. Todas as NRPSs estudadas no presente trabalho formaram um grupo monofilético com suporte de *bootstrap* de 97% na análise por *Neighbor-joining*, separando-se das demais enzimas formadoras de adenilatos utilizadas como grupos externos. Foi considerado que as NRPSs de *Colletotrichum* spp. que agruparam em clados contendo enzimas com funções conhecidas e comprovadas experimentalmente possuem a mesma função ou funções relacionadas. Por exemplo, os domínios A das toxinas AM sintetase de *Alternaria brassicicola* e de *Alternaria alternata* agruparam conjuntamente, possuindo portanto a mesma função. Foi observada a formação de clados de toxinas (Eniatina, Gliotoxina, toxina AM, Hts1), sideróforos (NPS6) e proteínas envolvidas com o ciclo sexual (NPS2), além de outros clados que não contêm qualquer NRPS com função conhecida. Com exceção de *C. higginsianum*, todas as espécies de *Colletotrichum* apresentaram uma cópia de NRPS relacionada à NPS6, agrupando no mesmo clado da NPS6 de *G. zeae* e *F. pseudograminearum* e no mesmo sub-clado da NPS6 de *C. heterostrophus*, possuindo provavelmente a mesma função, a produção de um importante sideróforo intracelular envolvido na patogênese. Os domínios AMP da NPS1 de *C. graminicola* agruparam sempre em conjunto dos domínios AMP da eniatina sintetase de *F. equiseti*, com suporte de *bootstrap* de 99%. Os genes NPS5 (*C. lindemuthianum* 83), NPS2 (*C. lindemuthianum* 89), NPS4 (*C. lindemuthianum* 7R), NPS3 (*C. orbiculare*) e NPS3 (*C. gloesporioides*) são monomodulares e agruparam em conjunto no mesmo clado contendo os dois domínios AMP da gliotoxina sintetase. Também foi formado um clado contendo todos os domínios AMP da NPS2 de *C. heterostrophus* e NRPSs de *Colletotrichum* spp. relacionadas com suporte de *bootstrap* para o grande clado de 79%. Os quatro domínios AMP da Hts1 agruparam em clados distintos ao longo da árvore de *neighbor-joining*, tendo sempre agrupado em conjunto com dos domínios AMP das proteínas de *C. lindemuthianum* (isolados 83, 89 e 7R), *C. orbiculare* e *C. gloesporioides*. Não foram encontradas NRPSs em *Colletotrichum* spp. altamente relacionadas à ACV sintetase. A árvore completa encontra-se apresentada na **Figura 8**.

Predição de substratos das NRPSs

Foi realizada também a predição da especificidade de domínios A das NRPSs que agruparam nos clados contendo a toxina-HC sintetase e com ferricrocina sintetase. Os resultados indicam que a toxina HC predita para as espécies de *Colletotrichum* spp. difere em suas sequências de aminoácidos da toxina HC de *Cochiobolus carbonum*. Em relação à NPS6, a especificidade do domínio A foi distinta somente para *C. lindemuthianum* (isolado 83) e para *C. fiorinae*. A **Figura 10** apresenta os resultados da especificidade dos domínios A.

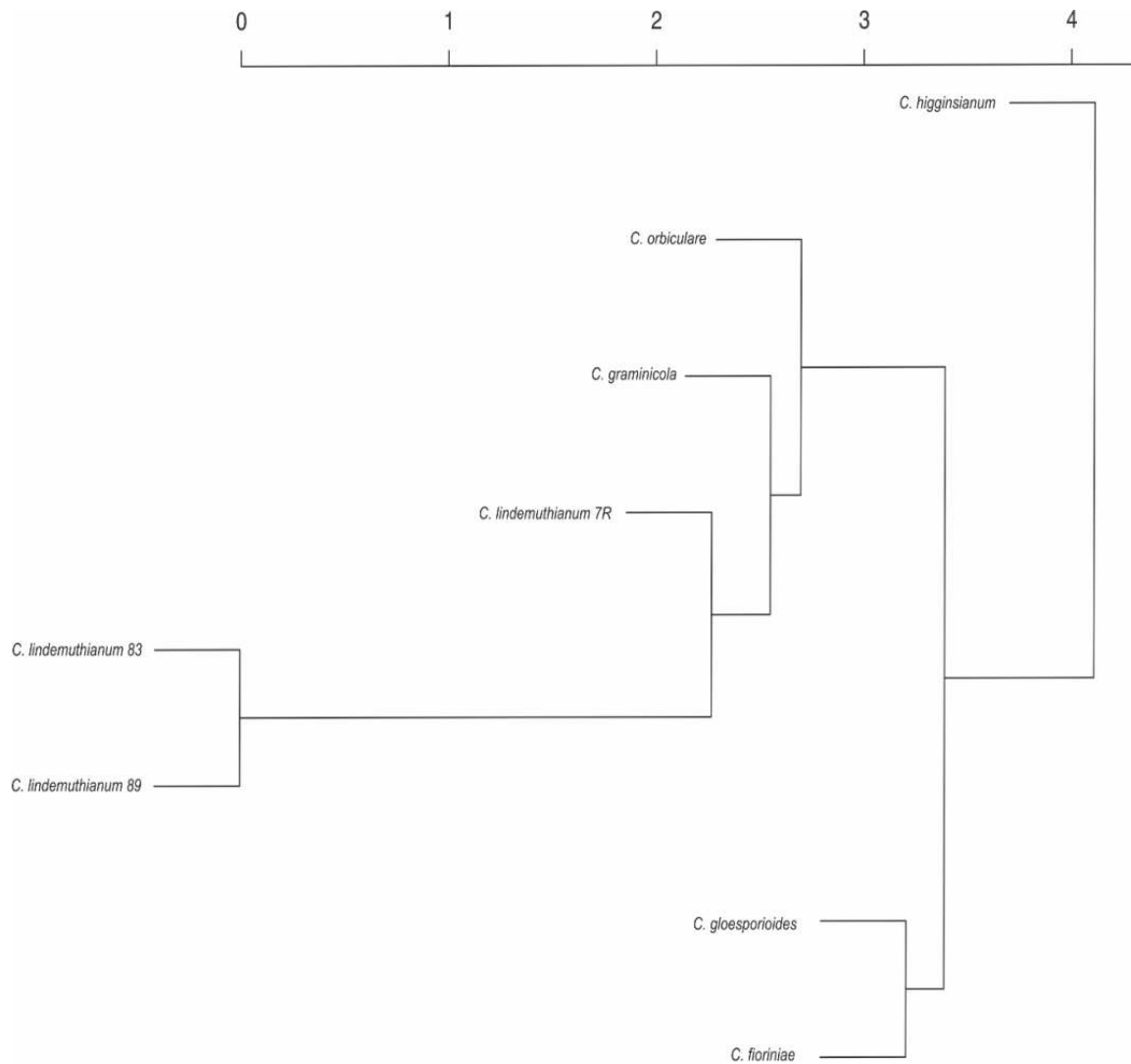


Figura 7. Agrupamento de espécies de *Colletotrichum* spp. pelo método UPGMA, com base na matriz binária da organização de suas NRPSs.

Identificação	Organização Modular	<i>C.lindemuthianum</i> (83)	<i>C.lindemuthianum</i> (89)	<i>C.lindemuthianum</i> (7R)	<i>C. gloesporioides</i>	<i>C.graminicola</i>	<i>C.orbiculare</i>	<i>C.florinae</i>	<i>C.higginsianum</i>
a1		-	-	-	NPS9	-	-	NPS1	-
a2		-	-	-	-	NPS3	-	-	-
a3		NPS7	NPS7	-	-	-	NPS5	-	-
a4		-	-	NPS2	-	-	-	-	-
a5		-	-	-	-	-	-	NPS4	-
b1		-	-	-	-	-	-	-	NPS22
b2		-	-	-	-	-	NPS8	-	-
b3		-	-	-	NPS10	-	-	-	-
b4		-	-	-	NPS1	-	-	-	-
b5		-	-	-	-	-	-	-	NPS8
b6		-	-	-	-	-	-	NPS5	-
b7		NPS2;NPS6	NPS5;NPS8	NPS3;NPS5	NPS6;NPS8	NPS5	NPS1;NPS6	-	NPS3;NPS5;NPS15;NPS
b8		-	-	NPS9	-	-	-	-	-
b9		-	-	NPS4	-	-	-	-	-
b10		-	-	-	NPS3;NPS7;NPS15	-	NPS7;NPS12	-	NPS2;NPS4;NPS11;NPS14; NPS19;NPS21
c1		-	-	-	-	-	NPS2	NPS6	-
c2		NPS1;NPS4	NPS1;NPS3	NPS8	NPS5	NPS4	NPS10	-	-
c3		-	-	-	NPS4	-	-	NPS3	NPS9
d1		-	-	-	-	NPS1	-	-	-
d2		-	-	-	-	-	-	-	NPS7
d3		NPS8	NPS4	NPS1	-	-	-	-	-
d4		-	-	-	-	-	-	-	NPS10
d5		-	-	-	NPS13	-	-	-	-
d6		-	-	-	-	-	-	-	NPS6;NPS12;NPS16
d7		NPS5	NPS2	-	-	-	NPS3	-	-
e1		NPS3	NPS6	NPS6	NPS11	-	NPS11	-	-
e2		-	-	-	-	-	NPS4	-	-
e3		NPS9	NPS9	NPS7	NPS2	NPS6	NPS9	NPS2	-
e4		-	-	-	NPS14	-	-	NPS7	NPS18
f1		-	-	-	-	-	-	-	NPS1
f2		-	-	-	-	-	-	-	NPS13
g1		-	-	-	-	-	-	-	NPS20

Figura 6. Organização das NRPSs em *Colletotrichum* spp. A: domínios de adenilação (retângulos vermelhos); T: domínios de tioilação (retângulos cinza); C: domínios de condensação (retângulos azuis); E: domínios de epimerização (retângulo roxo); MT: domínios metil-transferase (retângulos na coloração azul claro). Tx: Domínios tioesterase-redutase (retângulos amarelos).

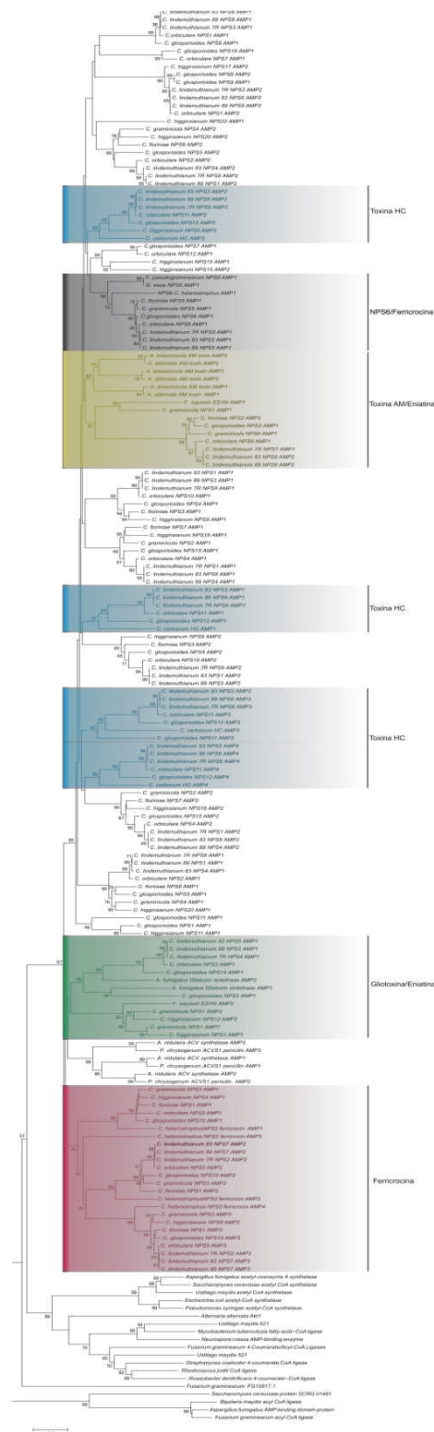


Figura 8. Árvore filogenética de *Neighbor joining* de NRPSs em *Colletotrichum* spp. Os valores apresentados indicam os níveis de confiança, acessados por 4000 replicatas do método de *bootstrap*. Retângulos azuis: Clados contendo pelos domínios A da Hts1; Retângulo amarelo: Clados contendo os domínios A da toxina-AM e da eniatina; Retângulo cinza: Clado contendo o domínio A da NPS6; Retângulo verde: Clado contendo os domínios A da gliotoxina sintetase; Retângulo rosa: Clado contendo os domínios A da ferrirocina sintetase.

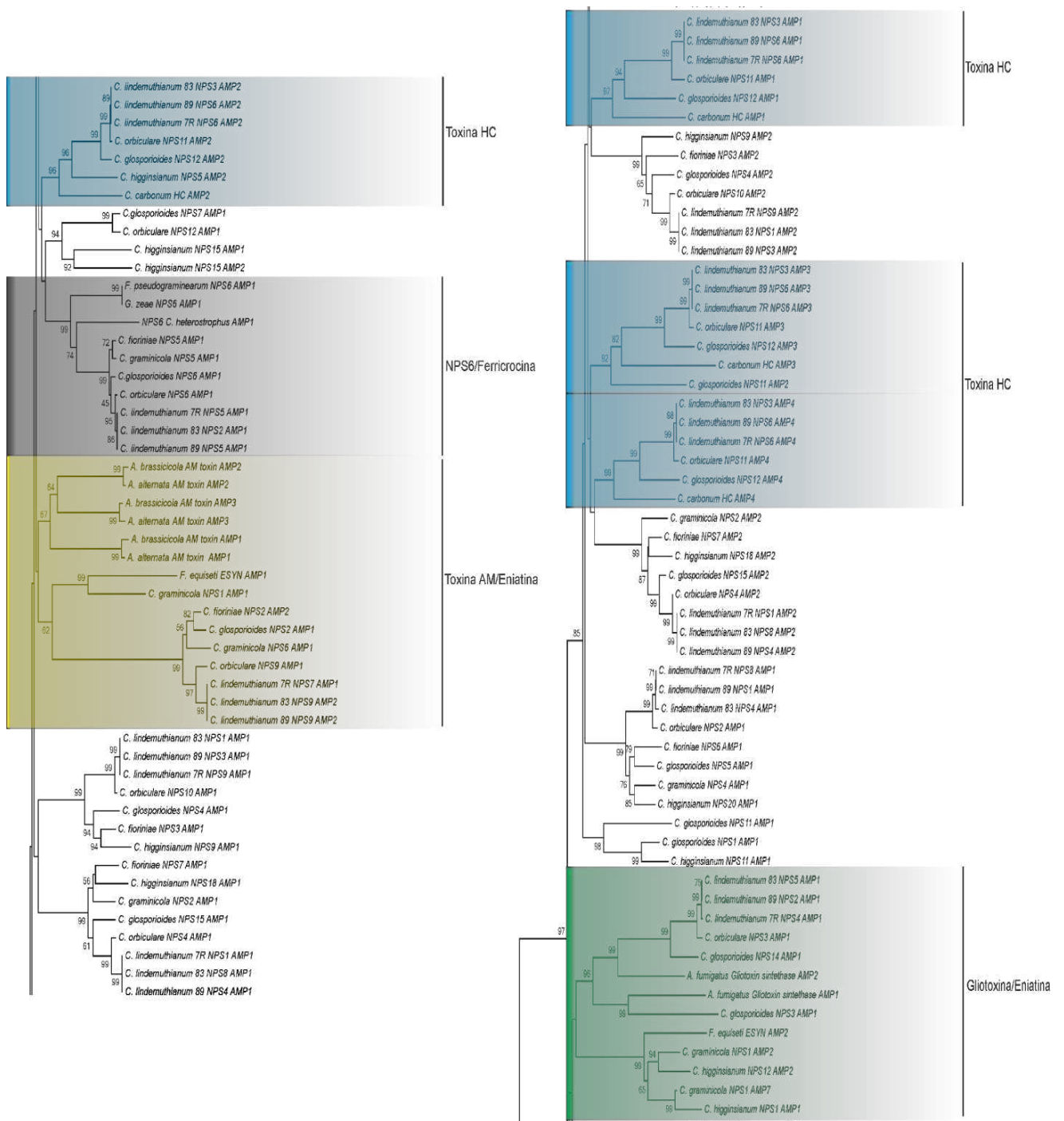


Figura 9 . Extraído da árvore de Neighbor-joining.

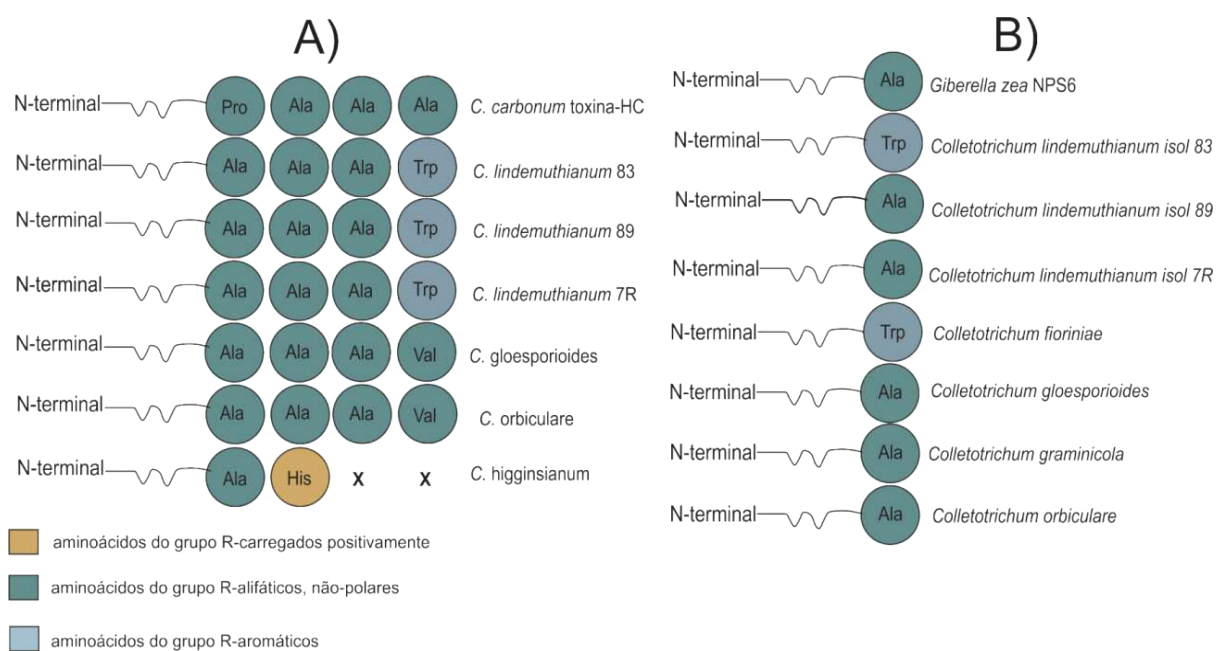


Figura 10. Sequência predita dos aminoácidos do peptídeo Hts1. Círculos verdes representam aminoácidos alifáticos, não-polares; cinzas aminoácidos do grupo R aromáticos; marrom aminoácidos do grupo R carregados positivamente.

Análise da expressão

A **Figura 11.** apresenta os resultados da análise da expressão das NRPSs em *C. lindemuthianum* (isolado 7R). Foi detectada a expressão de todos os genes de NRPSs em ao menos uma das fases de desenvolvimento. Os genes *NPS1*, *NPS2*, *NPS3* e *NPS8* foram expressos diferencialmente entre as fases. Surpreendentemente foram detectados transcritos de todos os genes de NRPSs durante a fase vegetativa (com exceção de *NPS4*), tendo essa fase coincido com o pico de expressão dos genes *NPS1*, *NPS3* e *NPS8*. O gene *NPS2* teve seu maior nível de expressão detectado durante a fase necrotrófica. O gene *NPS4* apresentou seu maior valor de expressão durante a fase apressorial. Os genes *NPS5*, *NPS6* e *NPS7* apresentaram a fase biotrófica como sua fase de maior expressão.

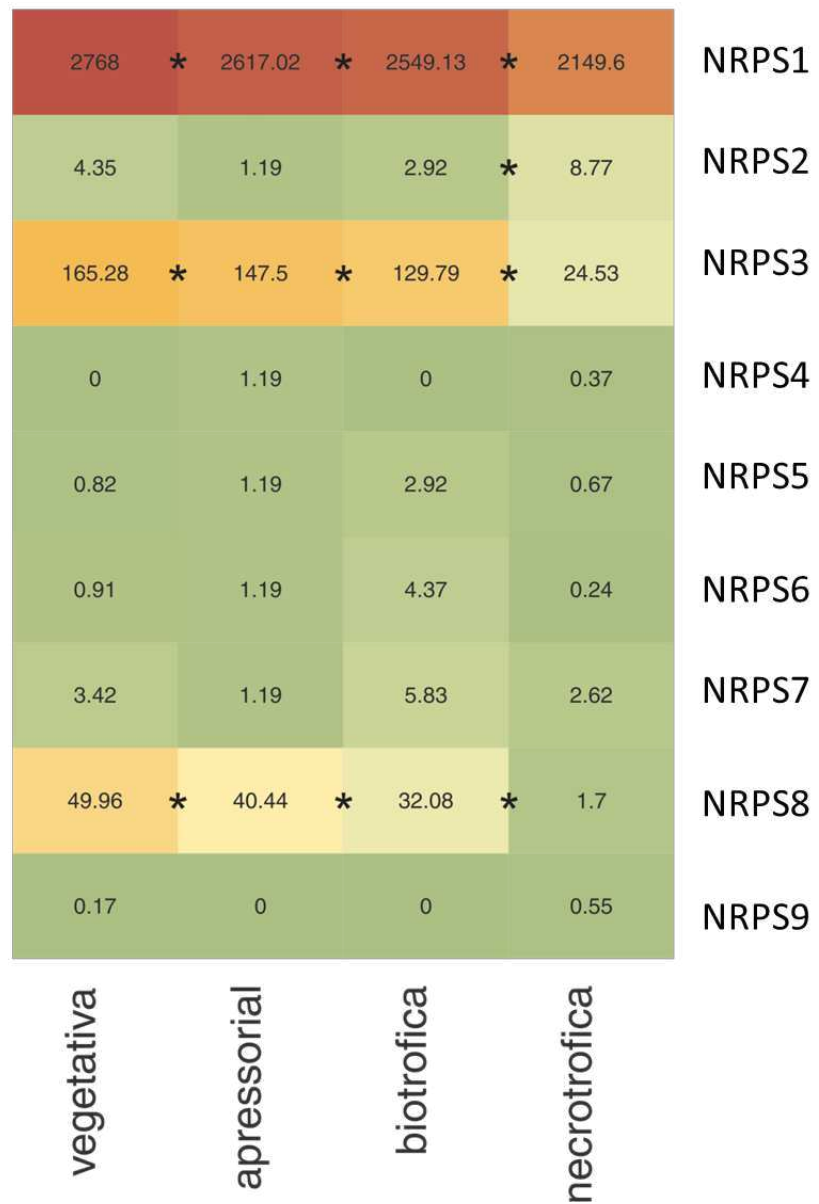
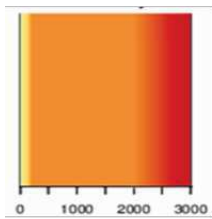


Figura 11. Número de reads mapeados de genes de peptidil sintetases não-ribossomais em *C. lindemuthianum* (isolado 7R) em quatro fases de desenvolvimento. Asteriscos entre duas fases indicam a ocorrência da expressão diferencial entre elas

DISCUSSÃO

No trabalho presente foram identificadas as peptidil sintetases não-ribossomais em *Colletotrichum* spp. e estas foram caracterizadas quanto ao contexto de localização, organização e filogeneticamente. Além disto, foi analisada a expressão ao nível de RNA do isolado e *C. lindemuthianum* 7R. Este é o primeiro trabalho mostra tal caracterização em fungos do gênero *Colletotrichum*. O número de genes que codificam NRPSs variou de 6 a 22 entre as espécies estudadas. Estes resultados indicam que assim como outros ascomicetos como: *Magnaporthe grisea* (8), *Fusarium graminearum* (12), *F. oxysporum* (8), *F. verticillioides* (10), *Haematonectria haematococca* (8), *Trichoderma reesei* (8), *Chaetomium globosum* (11), *Cochliobolus heterostrophus* (9), *Stagonospora nodorum* (10), *Aspergillus fumigatus* (14), *A. oryzae* (15), *A. terreus* (18), *A. niger* (12) e *Neosartorya fischer* (18), *Colletotrichum* spp. também possuem uma grande capacidade de produção destes metabólitos. Isto é mais fortemente evidenciado quando comparamos o número de genes que codificam NRPSs em *Colletotrichum* e em fungos basidiomicetos, tais como: *Cryptococcus neoformans* (0), *Ustilago maydis* (3), *Phanerochaete chrysosporium* (1), *Laccaria bicolor* (0), *Coprinopsis cinereus* (1), à zygomycetos, como: *Rhizopus oryzae* (0), *Phycomyces blakesleeanus* (0) e *Batrachochytrium dendrobatidis* (2), e à leveduras, como: *Saccharomyces cerevisiae* (0), *Shizosaccharomyces pombe* (1), *Pichia stipitis* (0) e *Candida albicans* (0) (Collemare et al., 2008).

Todas as proteínas identificadas em nosso estudo foram encontradas em clusters de metabolismo secundário, 93% dos quais contem uma ou mais outras enzimas biossintéticas. Tais resultados corroboram com Hertweck (2009), em levantamento que caracterizou os genes de peptidil sintetases não-ribossomais e policetídeo sintases como sendo geralmente encontrados em clusters de metabolismo secundário contendo outras enzimas biossintéticas ligadas ao metabolismo secundário, sendo estas geralmente NRPSs, PKs e TPSs. Oitenta e um por cento (81%) dos clusters de NRPSs contém proteínas relacionadas ao transporte, fornecendo assim indícios da possível secreção destes metabólitos.

A caracterização da arquitetura possibilitou a identificação de 32 sub-padrões de NRPSs de acordo com a organização, que foram agrupados em 7 grupos principais. Isto indica uma alta diversidade nos produtos destas maquinarias biossintéticas. Somente 30% das NRPSs identificadas no nosso trabalho possuem o domínio tioesterase reductase, sendo que este domínio é requerido para a liberação dos peptídeos formados pelas peptidil sintetases não-ribossomais. Isto indica que as demais NRPSs de *Colletotrichum* spp. (70%) são dependentes de estratégias alternativas aos processos de hidrólise e redução catalisados pelo domínio tioesterase reductase, que culminam na liberação do peptídeo. Dentre os possíveis mecanismos empregados por estas proteínas podemos citar o mecanismo dependente de PLP, primeiramente descrito primeiramente por Gerber *et al.* (2009) na proteína responsável pela biossíntese da fumosina em *Fusarium verticillioides*, ou o mecanismo de ciclização, identificado em duas NRPSs (TqaA e AnaPS) em *Sacharomyces cerevisiae* por Gao *et al.* (2012). Nossos resultados indicam que o padrão de distribuição das NRPSs não é um bom diferenciador de espécies, visto que as mesmas não apresentam um padrão lógico de distribuição ao longo das espécies de *Colletotrichum* spp. Apesar disto, a proteína com a organização *d3* é exclusiva de *C. lindemuthianum*, estando presente em cópia única em cada um dos proteomas avaliados. O maior valor de expressão mapeados para o gene desta proteína foi encontrado durante a fase vegetativa, indicando assim o seu envolvimento com funções requeridas para o crescimento fúngico.

A análise filogenética (**Figura 8**) indicou que apesar das NRPSs de *Colletotrichum* spp. possuírem uma relação evolutiva com algumas das enzimas formadoras de adenilatos utilizadas como grupos externos, existe uma distância evolutiva significativa, indicada pelo baixo suporte de *bootstrap* e pelo monofiletismo destas. Em nossa busca por ortólogos foi possível identificar NRPSs em *Colletotrichum* spp. altamente relacionados filogeneticamente à proteínas previamente estudadas em outros gêneros de fungos. Portanto, muito provavelmente estas desempenham funções similares. Foram identificadas NRPSs órtologas à Hts1 sintetase nas espécies *C. lindemuthianum*, *C. gloesporioides*, *C. orbiculare* e *C. higginsianum*. Este é o primeiro relato da identificação de ortólogos à Hts1 em *Colletotrichum*. Esta proteína, que foi primeiramente identificada em *Cochiobolus carbonum* e recentemente encontrada em *Alternaria jesenkae* por Wight *et al.* (2013) é responsável pela biossíntese de uma toxina hospedeiro-específica chamada toxina HC, que age através da alteração da expressão

gênica nas células do hospedeiro, o que ocorre por meio da inibição da atividade das histona desacetilases (Baidyaroy et al., 2002).

Também foram identificadas ortólogas à NPS6 de *Cochliobolus heterostrophus* em *C. lindemuthianum* (isolados 83, 89 e 7R), *C. fioriniae*, *C. graminicola*, *C. gloesporioides* e *C. fioriniae*. Esta proteína, foi primeiramente identificada por Turgeon et al. (2008), que através da análise funcional determinaram que esta proteína é responsável pela biossíntese de um sideróforo extracelular denominado *coprogen*, envolvido com a virulência deste fungo ao milho. Adicionalmente, através da análise funcional, esta proteína foi identificada como tendo sua função conservada em outros ascomicetos, tais como: *Alternaria brassicicola*, *Fusarium graminearum* e *Cochliobolus miyabeanus*. O maior valor de expressão detectado para o gene NPS6 foi encontrado durante a fase biotrófica (48 hpi) e o menor valor foi observado durante a fase necrotrófica (120 hpi), o que contrasta com os resultados obtidos por Albarouki et al. (2014) que avaliaram a expressão de diversos sideróforos *Colletotrichum graminicola*, e observaram que durante a fase biotrófica os sideróforos tem sua expressão fortemente suprimida e que durante a fase necrotrófica são altamente expressos. Possivelmente este contraste deve-se ao fato de que no patossistema *Colletotrichum lindemuthianum*-feijoeiro às 48 horas após o contato do fungo com o tecido vegetal a fase necrotrófica já tenha sido iniciada, mesmo sem a observação de sintomas aparentes no tecido vegetal e que as 120 horas após o contato do fungo com o tecido vegetal o processo já tenha sido finalizado.

Os ortólogos da Hts1 identificados no presente trabalho consistem em NRPSs tetramodulares, estando assim de acordo com o que foi referido por Walton (2006). Adicionalmente, foram obtidas as sequências preditas de aminoácidos dos tetrapeptídeos produtos da Hts1 e de seus ortólogos. As sequências preditas dos tetrapeptídeos são ligeiramente diferentes entre as espécies de *Colletotrichum* e *C. carbonum*. Isto indica que estes produzem uma toxina HC modificada ou possivelmente um produto com atividade distinta, que é altamente relacionado filogeneticamente à toxina HC, sendo necessários mais estudos acerca do assunto. Dois módulos da Hts1 estão ausentes em *C. higginsianum*. Esta ausência dos dois últimos módulos indica que estes podem ter sido perdidos ao longo do tempo ou que as demais espécies que apresentam este gene os ganharam. O gene NPS6 de *C. lindemuthianum* 7R, que foi identificado como ortólogo da Hts1 de *C. carbonum* teve seu maior valor de expressão a nível de RNA detectado

durante a fase biotrófica (48 hpi) e seu menor valor durante a fase necrotrófica (120 hpi). Curiosamente esta proteína é altamente relacionada filogeneticamente à Hts1, responsável pela biossíntese da toxina HC. Esta maior expressão durante a fase biotrófica pode indicar que esta toxina tem sua expressão aumentada ao fim da fase biotrófica (48 hpi). Aqui nós consideramos 120 horas após a inoculação como o ponto de coleta e extração de RNA para a representação da fase necrotrófica. No entanto, nesta fase da doença o tecido vegetal encontra-se em sua grande maioria degradado (Queiroz et al., 2012). Deste modo, nesta fase a produção de toxinas pode ser dispensável, justificando assim, o baixo nível de expressão de NPS6 em *C. lindemuthianum* 7R durante esta fase. Sendo assim, se faz necessária a realização de uma análise da expressão deste gene durante mais fases de desenvolvimento.

A maioria dos genes NRPSs teve foi expresso em baixos níveis durante a fase vegetativa, corroborando com Hertweck (2009), que afirma que os clusters de genes biossintéticos de metabolismo secundário são geralmente suprimidos sob a condição de crescimento *in vitro*, pois não são requeridos para o crescimento. No entanto, os genes *NPS1*, *NPS3* e *NPS8* apresentaram seu maior valor de expressão durante esta fase. Isto pode indicar que a função destes produtos é requerida durante esta fase, e que seus papéis biológicos podem ser ainda desconhecidos. O gene *NPS4* não teve sua expressão detectada durante a fase vegetativa, o que segundo O'Connell *et al.* (2012) pode ocorrer pelo fato de que alguns genes são expressos somente durante o contato do fungo com a planta.

Algumas das NRPSs identificadas durante o presente trabalho não agruparam em conjunto com qualquer uma das proteínas de funções previamente caracterizadas, utilizadas como referência na análise filogenética. Este resultado pode ser um indício de que os produtos das peptidil sintetases não-ribossomais de *Colletotrichum* spp. possuem funções fisiológicas que não foram relatadas até o presente momento. Sendo assim, se fazem necessários estudos acerca da função das NRPSs em *Colletotrichum* spp.

CONCLUSÃO

Assim como em outros ascomicetos, as NRPSs são abundantes em *Colletotrichum* spp., e algumas destas consistem em órtologos de enzimas responsáveis pela biossíntese de produtos requeridos para a virulência de fitopatógenos. Todas as NRPSs de *Colletotrichum lindemuthianum* (isolado 7R) são requeridas em ao menos uma das fases do desenvolvimento do fungo, e suas funções parecem ser bastante diversificadas. Apenas uma NRPS é específica para a espécie *C. lindemuthianum*, sendo que o padrão de distribuição das demais não é espécie-específico em *Colletotrichum*. São necessários mais estudos acerca da expressão e função das NRPSs em *Colletotrichum lindemuthianum*.

REFERÊNCIAS

ALBAROUKI, Emad et al. Biotrophy-specific downregulation of siderophore biosynthesis in *Colletotrichum graminicola* is required for modulation of immune responses of maize. **Molecular microbiology**, v. 92, n. 2, p. 338-355, 2014.

ANDREWS, S. et al. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010.

BAIDYAROY, Dipnath et al. Characterization of inhibitor-resistant histone deacetylase activity in plant-pathogenic fungi. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 4, p. 538-547, 2002.

BARHOOM, S.; SHARON, A. cAMP regulation of “pathogenic” and “saprophytic” fungal spore germination. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 317–326, 2004.

BARONCELLI, R. et al. Draft genome sequence of *Colletotrichum sublineola*, a destructive pathogen of cultivated sorghum. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. e00540-14, 2014.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M. ; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, p. btu170, 2014.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

BONETT, L. P. et al. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Arquivos de Ciências da Saúde, UNIPAR**, v. 11, n. 3, p. 235-246, 2007.

ADDIN Mendeley Bibliography CSL_BIBLIOGRAPHYBRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum*, current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.

CANE, D. E. Introduction: Polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. From collie to coli. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 7, p. 2463-2464, 1997.

CANE, D E.; WALSH, C. T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 12, p. R319-R325, 1999.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

CENTIS, S. et al. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI**, v. 10, n. 6, p. 769–75, 1997.

CENTIS, S., GUILLAS, I., SE' JALON, N., ESQUERRE' -TUGAYE' , M-T., DUMAS, B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI**. 10: 769–775.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

CORDA ACI (1831) Die Pilze Deutschlands : Deutschlands Flora in Abbildungennach der Natur mit Beschreibungen Sturm, Nürnberg.

CORDA, A. C. I. ACI 1837-1854. **Icones fungorum hucusque cognitarum**, v. 6, 1837.

COLLEMARE, Jérôme et al. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 207-215, 2008.

COSTA, J. G. C.; RAVA, CARLOS AGUSTÍN; ZIMMERMANN, FRANCISCO JOSÉ PFEILSTICKER. Comparação da eficiência de métodos de seleção em gerações segregantes de feijoeiro-comum considerando a resistência à antracnose e o rendimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 244-251, 2002.

CRAMER, R. A. et al. Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus*. **Gene**, v. 383, p. 24-32, 2006.

CROUCH, J. et al. The Genomics of *Colletotrichum*. In: Ralph A. Dean. *Genomics of Plant-Associated Fungi : Monocot Pathogens*. New York: **Springer Heidelberg**, 2014, 69-102.

DEAN, R. A et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 980–986, 2005.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DU, M. et al. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 641-658, 2005.

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985.

GAO, Xue et al. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 823-830, 2012.

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.

GAUTAM, A. K. Physiology & Pathology Colletotrichum gloeosporioides : Biology , Pathogenicity and Management in India. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 2, n. 2, p. 2–11, 2014.

GERBER, R; LOU, L; DU, L. A PLP-dependent polyketide chain releasing mechanism in the biosynthesis of mycotoxin fumonisins in Fusarium verticillioides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 9, p. 3148-3149, 2009.

GILLIAN TURGEON, B.; OIDE, S.; BUSHLEY, K. Creating and screening Cochliobolus heterostrophus non-ribosomal peptide synthetase mutants. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 200–206, 2008.

HANSEN, F. T. et al. Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in Fusarium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 128–136, 2012a.

HANSEN, F. T. et al. Overexpression of NRPS4 leads to increased surface hydrophobicity in fusarium graminearum. **Fungal Biology**, v. 116, n. 8, p. 855–862, 2012b.

HANSEN, F. T. et al. An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in Fusarium. **Fungal Genetics and Biology**, v. 75, p. 20-29, 2015.

HERTWECK, C.. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 26, p. 4688-4716, 2009.

JONES, A. L. Phaseolus bean: Post-harvest operations. **AGSI/FAO: Mejia D. and Lewis B. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**. pp, p. 1-24, 1999.

KEATING, Thomas A. et al. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, n. 7, p. 522-526, 2002.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

KLEEMANN J, T. H, S. K, O'CONNELL. R. (2008) Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. **Microbiology** 154(4):1204–1217.

KUBO, Y.; TAKANO, Y. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. **Journal Of General Plant Pathology**, v. 79, n. 4, p. 233-242, 2013.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 3, p. 437-447, 2007.

LEE, B. et al. Functional Analysis of All Nonribosomal Peptide Synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* Reveals a Factor, NPS6, Involved in Virulence and Resistance to Oxidative Stress. **Eukaryotic**, v. 4, n. 3, p. 545–555, 2005a.

LEE, B. N. et al. Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 3, p. 545–555, 2005b.

- LIAO, C.-Y. et al. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 262-270, 2012.
- MEDEIROS, L. A. Resistência do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) Ao *Colletotrichum lindemuthianum*. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade federal de santa maria. Santa maria, Rio Grande do Sul.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIO E ABASTECIMENTO- MAPA. Dados da cultura do feijão. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em 10/12/14.
- MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; TOYOZO, S. A. T. O. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, n. 4, p. 307-320, 2002.
- MÜNCH, Steffen et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.
- O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. Host specificity, pathology, and host–pathogen interaction of *Colletotrichum*. **American Phytopathology Society Press, St Paul**, p. 57-77, 2000.
- O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060–1065, 2012.
- OIDE, S. et al. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. **The Plant Cell**, v. 18, n. 10, p. 2836–2853, 2006.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. Faostat: Dados da produção de mundial de Feijão. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/e>>. Acesso em: 10 março 2015.

PERFECT, S. E. et al. Colletotrichum: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics And Biology : FG & B**, v. 27, n. 2-3, p. 186–198, 1999.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-108, 2001.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 413-434, 1996.

RAFFAELE, S.; KAMOUN, S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 417–430, 2012.

RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W.; SEIFERT, K. A. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 163–191, 2011.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCOTT-CRAIG, J. S. et al. The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus Cochliobolus carbonum is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 26044-26049, 1992.

SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHWARTZ, H. F. et al. Bean production problems. Disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. **CIAT., 1980**.

SCHWECKE; TORSTEN et al. Nonribosomal Peptide Synthesis in Schizo *Saccharomyces pombe* and the Architectures of Ferrichrome-Type Siderophore

Synthetases in Fungi. **European Journal of Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 612-622, 2006.

SHERRIFF, C. et al. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v. 18, n. 2, p. 121-138, 1994.

SIEBER, S. A; MARAHIEL, M. A. Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. **Chemical. Reviews.**, v. 105, n. 2, p. 715–738, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, AVERIL E.; MILLS, P. R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 265-281, 1992.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, v. 39, n. 3, p. 499-512, 1996.

STANKE, M. et al. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 637-644, 2008.

TAMBADOU, F. et al. Novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 357, n. 2, p. 123-130, 2014.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, p. mst197, 2013.

TALAVERA, Gerard; CASTRESANA, Jose. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic biology**, v. 56, n. 4, p. 564-577, 2007.

THROWER, L. B. Terminology for plant parasites. **Journal of Phytopathology**, v. 56, n. 3, p. 258-259, 1966.

TOBIASEN, C. et al. Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. **Current Genetics**, v. 51, n. 1, p. 43-58, 2007.

TSUNAWAKI, S. et al. Fungal Metabolite Gliotoxin Inhibits Assembly of the Human Respiratory Burst NADPH Oxidase Fungal Metabolite Gliotoxin Inhibits Assembly of the Human Respiratory Burst NADPH Oxidase. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3373–3382, 2004.

VARGAS, W. A. et al. Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotricum graminicola* in Maize. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1342–1358, 2012.

WALKER, John Charles. **Onion smudge**. 1921.

WALTON, J. D. HC-toxin. **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1406–1413, 2006.

WIGHT, W D.; LABUDA, R; WALTON, J. D. Conservation of the genes for HC-toxin biosynthesis in *Alternaria jesenskae*. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 165, 2013.

ZAUMEYER, W. J. REX, H. A Monographic study of bean diseases and methods for their control. 1957.