

LEANDRO LOPES DA SILVA

MICROBIOTA DO FEIJOEIRO-COMUM E PECTINASES DE *Colletotrichum lindemuthianum*

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

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Cynthia Canêdo da Silva
Janaina Aparecida Teixeira
Tiago Antônio de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

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

T

S586m
2020
Silva, Leandro Lopes da, 1991-
Micobiota do feijoeiro-comum e pectinases de
Colletotrichum lindemuthianum / Leandro Lopes da Silva. –
Viçosa, MG, 2020.
111 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. Enzimas. 3. Antracnose. 4. Feijão
- Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

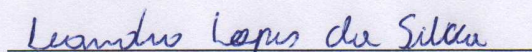
LEANDRO LOPES DA SILVA

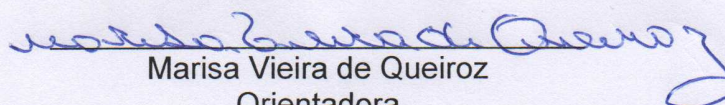
MICROBIOTA DO FEIJOEIRO-COMUM E PECTINASES DE *Colletotrichum*
lindemuthianum

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

APROVADA: 07 de dezembro de 2020

Assentimento:


Leandro Lopes da Silva
Autor


Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

A minha mãe, Maria Lucília, por me apoiar e incentivar durante toda a minha trajetória.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Lucília e Manoel, e irmãs, Lucineide e Lucileide, pelo apoio, afeto e por sempre acreditarem em mim;

A minha família, que por mesmo estando longe sempre tem me dado apoio;

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar o curso;

A todos os professores pela facilitação de conhecimento que contribuíram para a minha formação;

A professora Marisa Vieira de Queiroz pela orientação, disponibilidade, incentivo e todos os conhecimentos transmitidos;

Aos professores Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Cynthia Canêdo da Silva e a Dra. Janaina Aparecida Teixeira pela coorientação e por toda contribuição nos momentos que precisei;

Aos amigos padrão biologia molecular (Ana Carolina, Alan Emanuel, Géssica, Giarlã, Leandro Cardoso, Mayara, Maria Vásconez e Michelle) pela amizade e bons momentos juntos;

A todos do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos e de outros laboratórios do BIOAGRO. Em especial a Ângela, Ediones, Fernando, Janaina Lana, Jéssica Rosa, Hanna, Hilberty Lucas, Luiz Felipe, Mirele, Mísia, Osiel, Patrícia, Raíssa, Rafael, pela convivência, troca de conhecimentos, amizade, conversas e momentos de distração;

A todos que de alguma forma contribuíram nessa etapa da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da 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 ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

RESUMO

SILVA, Leandro Lopes da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Micobiota do feijoeiro-comum e pectinases de *Colletotrichum lindemuthianum***. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Cynthia Canêdo da Silva, Janaina Aparecida Teixeira e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Tanto micro-organismos endofíticos como fitopatogênicos são capazes de colonizar o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*). Muitos micro-organismos endofíticos são conhecidos por beneficiarem a planta hospedeira. Para identificar esses micro-organismos, um dos métodos utilizados é o sequenciamento de alto rendimento. Alguns micro-organismos também podem prejudicar as plantas hospedeiras, como o fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum*. Esse fungo é responsável por causar antracnose no feijoeiro-comum, ocasionando perdas na produtividade dessa cultura. Nos fungos fitopatogênicos, as enzimas que degradam a pectina presente no tecido vegetal são consideradas importantes fatores de virulência. Os principais objetivos desse trabalho foram determinar a micobiota de três variedades de feijoeiro-comum; identificar e analisar genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum*; inativar por meio da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) e caracterizar funcionalmente genes que codificam pectinases. Ao analisar a micobiota endofítica do feijoeiro-comum foi observado que a diversidade de fungos variou mais entre os órgãos da planta do que entre as variedades. Foram identificados 283 gêneros, distribuídos entre as variedades. Em cada órgão da planta e na rizosfera foram identificados diferentes números de gêneros. Foi encontrado um maior número de interações positivas nos órgãos da parte aérea em todas as variedades. Para conhecer as pectinases produzidas por *C. lindemuthianum*, os genes que codificam pectinases foram identificados e analisados. O fungo *C. lindemuthianum* possui 58 genes que codificam para pelo menos seis tipos de enzimas envolvidas na degradação da pectina. Esses genes apresentam em sua região promotora sítios de ligação para diferentes fatores transcricionais. O número de introns foi variável entre os genes. Quarenta e cinco por cento dos genes são diferencialmente expressos em algum momento na interação com o seu hospedeiro. As pectinases putativas apresentaram sítios para N-glicosilação, presença de peptídeo sinal e diferentes pontos isoelétricos. Foram obtidos de 35 a 56 transformantes para cada gene em

condições iguais de transformação. Todos os transformantes analisados apresentaram uma única cópia do cassete de deleção. Foram obtidos dois mutantes para o gene *pecC16* (pectato lisase 6 de *C. lindemuthianum*). Os mutantes $\Delta pecC16$ obtidos não apresentaram diferença de morfologia, crescimento, esporulação e patogenicidade em relação ao selvagem. Neste trabalho foi observado que a diversidade de fungos endofíticos pode ser acessada de forma eficiente com o sequenciamento de amplicons ITS e que essa diversidade pode variar entre órgãos vegetais distintos e a rizosfera de uma única variedade de planta. Também foi constatada a presença de maior quantidade e diversidade de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* do que o encontrado em outros fitopatógenos, o que sugere que pelo menos parte destas pectinases devem ser importantes para a patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*. Além disso, foi demonstrado que o sistema ATMT pode ser utilizado para deleção de genes em *C. lindemuthianum*.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos. Sequenciamento de amplicons ITS. Antracnose. Enzimas pectinolíticas. Transformação de fungo.

ABSTRACT

SILVA, Leandro Lopes da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Common bean mycobiota and *Colletotrichum lindemuthianum* pectinases.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisors: Cynthia Canêdo da Silva, Janaina Aparecida Teixeira and Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Both endophytic and phytopathogenic microorganisms are capable of colonizing the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Many endophytic microorganisms are known to benefit the host plant. To identify these microorganisms, one of the methods used is high-throughput sequencing. Some microorganisms can also harm host plants, such as the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. This fungus is responsible for causing anthracnose in the common bean, causing losses in the productivity of this crop. In phytopathogenic fungi, enzymes that degrade the pectin present in plant tissue are considered to be important virulence factors. The main objectives of this work were to determine the mycobiota of three common bean varieties; identify and analyze genes that encode pectinases in *C. lindemuthianum*; inactivate and functionally characterize genes that encode pectinases using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. When analyzing the endophytic mycobiota of the common bean, it was observed that the diversity of fungi varied more between the organs of the plant than between the varieties. A total of 283 genera were identified, distributed among the varieties. Different numbers of genera were identified in each organ and rhizosphere. A greater number of positive interactions were found in the aerial part organs in all varieties. To know the pectinases produced by *C. lindemuthianum*, the genes that encode pectinases were identified and analyzed. The fungus *C. lindemuthianum* has 58 genes that code for at least six types of enzymes involved in the degradation of pectin. These genes have binding sites for different transcriptional factors in their promoter region. The number of introns varied between genes. Forty-five percent of the genes are differentially expressed at some point in the interaction with their host. The putative pectinases showed sites for N-glycosylation, the presence of signal peptide, and different isoelectric points. For the functional study of genes encoding pectinases in *C. lindemuthianum*, the transformation technique mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was used. Thirty-five to 56 transformants were obtained for each gene under equal conditions of transformation. All analyzed

transformants presented a single copy of the cassette. Two mutants for the *pecCl6* gene were obtained (*C. lindemuthianum* pectate lyase 6). The Δ *pecCl6* mutants obtained showed no difference in morphology, growth, sporulation, and pathogenicity compared to the wild. In this work, it was observed that the diversity of endophytic fungi can be accessed efficiently with the sequencing of ITS amplicons and that this diversity can vary between different plant organs and the rhizosphere of a single plant variety. The presence of a greater quantity and diversity of genes encoding pectinases in *C. lindemuthianum* was also found than that found in other phytopathogens, which suggests that at least part of these pectinases must be important for the pathogenicity of the fungus *C. lindemuthianum*. Also, it has been shown that the ATMT system can be used to delete genes in *C. lindemuthianum*.

Keywords: Endophytic microorganisms. ITS amplicon sequencing. Anthracnose. Pectinolytic enzymes. Fungal transformation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
Capítulo 1	13
The plant organs and rhizosphere determine the common bean mycobiome ..	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUCTION.....	14
MATERIAL AND METHODS	16
Experimental design and sample preparation	16
DNA extraction and sequencing.....	16
Sequence analysis.....	17
RESULTS.....	17
Alpha and beta diversities	18
Endophytic fungal communities present in organs and in the rhizosphere of the common bean varieties.....	18
Structure of the interaction network of endophytic fungi in the different organs.....	19
DISCUSSION.....	20
LITERATURE CITED	23
Capítulo 2	37
O arsenal pectinolítico de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e de outros fungos com diferentes estilos de vida	38
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	42
Micro-organismos e condições de cultivo	42
Identificação e caracterização de pectinases em <i>C. lindemuthianum</i>	43
Perfil de expressão de genes de pectinases no transcriptoma de <i>C.</i> <i>lindemuthianum</i> em interação com o feijoeiro-comum.....	44
Análise de agrupamento de sequências de pectinases e distribuição de pectinases em fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida	44
Determinação da atividade de pectinases	45
RESULTADOS.....	46
Pectinases em <i>C. lindemuthianum</i>	46
Perfil de expressão de pectinases em <i>C. lindemuthianum</i>	48

Similaridade de pectinases de <i>C. lindemuthianum</i> com pectinases de outros fungos do gênero <i>Colletotrichum</i>	49
Distribuição de pectinases em <i>Colletotrichum</i> spp. e em fungos com diferentes estilos de vida	50
Atividade enzimática de pectinases.....	51
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	60
Capítulo 3	83
Deleção de gene em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	84
RESUMO.....	84
INTRODUÇÃO	85
MATERIAL E MÉTODOS	87
Micro-organismos e condições de cultivo	87
Extração de RNA e síntese de cDNA.....	88
Seleção dos genes e avaliação da expressão diferencial por qPCR	89
Construção dos cassetes de deleção	89
Transformação de <i>C. lindemuthianum</i>	90
Extração de DNA.....	90
Análise dos transformantes: PCR e Southern blot.....	91
Teste de patogenicidade e avaliação dos sintomas	91
RESULTADOS.....	92
Expressão de genes que codificam pectinases em <i>C. lindemuthianum</i> na interação com o feijoeiro-comum.....	92
Transformação de <i>C. lindemuthianum</i> e análise dos transformantes	92
Análise funcional do gene <i>pecCl6</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	94
DISCUSSÃO	94
REFERÊNCIAS.....	99
CONCLUSÕES	111

INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma importante cultura para o Brasil, sendo o feijão um componente essencial na alimentação da população brasileira, apresentando importância tanto econômica quanto nutricional. Na alimentação humana, o feijão é um dos principais constituintes, devido a sua riqueza em proteínas. Além disso, a cultura do feijão é plantada principalmente por pequenos e médios produtores, cujo o sustento provém dessa cultura.

O feijoeiro-comum, assim como as diversas espécies vegetais, é colonizado por micro-organismos que não causam danos aparentes ao hospedeiro, conhecidos como endofíticos. Esses micro-organismos podem estar presentes em toda a planta, colonizando os seus diferentes órgãos. A presença desses endofíticos podem oferecer vantagens ao hospedeiro como adaptação a diferentes ambientes, tolerância a fatores abióticos como elevadas temperaturas e salinidade e resistência a pragas e doenças. Alguns trabalhos já foram realizados com a finalidade de estudar a diversidade, tanto de fungos quanto de bactérias endofíticas presentes no feijoeiro-comum. Porém, como os principais métodos de estudo de diversidade de micro-organismos endofíticos são baseados em isolamento, cultivo e identificação, a microbiota total presente geralmente é subestimada. A utilização de sequenciamento de amplicons ITS (espaçadores internos transcritos do rDNA) permite acessar a diversidade de micro-organismos endofíticos não cultiváveis e essa metodologia vem sendo amplamente utilizada para diversas espécies vegetais. No feijoeiro, as análises de diversidade com essa abordagem só foram realizadas para a rizosfera dessa espécie vegetal, então pouco se conhece sobre composição endofítica total presente no feijoeiro.

Além dos endofíticos, alguns micro-organismos fitopatogênicos podem colonizar o feijoeiro-comum causando doenças. Esses são responsáveis por grandes perdas na produção dessa cultura. Um dos principais patógenos do feijoeiro-comum é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* que causa uma doença conhecida como antracnose. Esse fungo é hemibiotrófico, possuindo uma fase biotrófica (assintomática) e uma fase necrotrófica (sintomática), na qual ocorre a maceração do tecido vegetal devido a ação de diferentes enzimas. Entre essas enzimas estão as pectinases, que realizam a degradação da pectina presente na lamela média e parede celular primária dos vegetais.

Devido a característica complexa da pectina, várias enzimas com diferentes funções são necessárias para a sua completa degradação. As principais enzimas envolvidas na degradação da pectina são poligalacturonases, pectina liases, pectato liases e pectinesterases. As pectinases produzidas pelos fungos fitopatogênicos são consideradas um importante fator de virulência. O fungo *C. lindemuthianum*, assim como os demais fungos fitopatogênico, sintetizam e secretam diferentes enzimas pectinolíticas que são envolvidas na degradação da parede celular vegetal, sendo fundamentais para o desenvolvimento da doença. Até o momento, não se conhecia a gama de enzimas pectinolíticas produzidas pelo fungo *C. lindemuthianum*.

Devido ao número de enzimas produzidas pelos fungos que são importantes para a patogenicidade, nem sempre é fácil identificar a função dessas enzimas. Desse modo, o emprego de técnicas como mutagênese sítio-dirigida auxilia na identificação de genes relacionados com a patogenicidade. Por meio dessas técnicas é possível inativar de forma direcionada um ou mais genes de interesse e analisar o comportamento do fungo na interação com seu hospedeiro. Para isso, algumas metodologias de transformação são utilizadas como a transformação mediada por protoplastos (PMT) e a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). A metodologia PMT já vem sendo utilizada em *C. lindemuthianum* com o objetivo de estudo funcional de genes, no entanto, a técnica ATMT com esse mesmo objetivo ainda não havia sido utilizada.

Diante do exposto, os principais objetivos desse trabalho foram analisar a microbiota endofítica de diferentes órgãos vegetais e rizosférica de três genótipos de feijoeiro-comum, identificar e analisar genes que codificam pectinases no genoma do fungo *C. lindemuthianum*, avaliar a expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* e comparar as pectinases putativas encontradas em *C. lindemuthianum* com as pectinases produzidas por fungos do gênero *Colletotrichum*. Analisar funcionalmente genes candidatos em *C. lindemuthianum* por mutação sítio dirigida utilizando o sistema de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Capítulo 1

The plant organs and rhizosphere determine the common bean mycobiome

Publicado na *Brazilian Journal of Microbiology*

DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00217-9>

The plant organs and rhizosphere determine the common bean mycobiome

Leandro L. da Silva^a; Tomás G. R. Veloso^a; Jonathan H. C. Manhães^a; Cynthia C. da Silva^a; Marisa V. de Queiroz^{a*}.

^aDepartamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil.

*E-mail: mvqueiro@ufv.br; Tel.: +55-31-3612-2451.

Publicado na Brazilian Journal of Microbiology
DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00217-9>

ABSTRACT

The plant microbiota diversity is often underestimated when approaches developed mainly for the identification of cultivable microorganisms are used. High-throughput sequencing allows a deeper understanding the microbial diversity associated with plants. The amplification of ITS1 was used to analyze fungal diversity in several plant organs and rhizosphere of three common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties grown in a greenhouse. The fungal diversity diverged between those plant organs and the rhizosphere, with the highest found in the rhizosphere and the lowest in the stem. In each organ different numbers of genus OTUs were identified, in a total of 283 OTUs evenly distributed among the varieties. In the co-occurrence network a larger number of positive interactions was found in the organs of the aerial part in all varieties. We observed that the diversity of the endophytic microbiota differed more between plant organs than between common bean varieties. Our results show that the diversity of endophytic fungi can be efficiently accessed with the sequencing of ITS amplicons, and that this diversity may vary among distinct plant organs and the rhizosphere of a single plant variety.

Key words: Cultivation-independent approach; Endophytic community; ITS amplicon sequencing; Mycobiome; *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUCTION

Endophytic microorganisms are able to colonize plant species without causing any disease (PETRINI, 1991). These microorganisms can be transmitted vertically by

plants to their seeds or horizontally by inoculum from other plants or soil (RODRIGUEZ et al., 2009). The presence of these microorganisms inside plant organs may even be beneficial to them, promoting growth, tolerance to abiotic stresses and disease resistance (RODRIGUEZ et al., 2009). Besides adaptive advantages, they provide to the host plants, these microorganisms can synthesize secondary metabolites with medical, agronomic, industrial or biotechnological importance (HARDOIM et al., 2015; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Endophytic microorganisms are usually identified through isolation from the host plant followed by morphological and/or molecular characterization of the cultivated microorganisms (ARNOLD; LUTZONI, 2007; DING et al., 2013). However, one of the limitations in the study of endophytic communities is the methodology used. With the introduction of high-throughput sequencing, it became possible to achieve a deeper understanding of how the endophytic microbiota is composed.

Amplicon sequencing has been widely used to analyze endophytic microorganisms, since it enables to reach a deeper layer of the microbial community colonizing several agriculturally important plant species (MÜLLER et al., 2015; SOUZA et al., 2016). It was observed that the endophytic fungal diversity found in plants grown under the same conditions changes during their life cycle (AMBARDAR et al., 2016), in the same way different plant organs of a single individual such as fruit, stem and leaves can present distinct endophytic compositions (ABDELFATTAH et al., 2016). Cultivation practices usually adopted in agricultural systems such as the application of pesticides (ABDELFATTAH et al., 2016) and the use of different genotypes of a single plant species (BÁLINT et al., 2013; MASHIANE; EZEOKOLI; ADELEKE, 2017) changes the endophytic community structure.

Like many plant species, the common bean (*Phaseolus vulgaris*) can be colonized by endophytic microorganisms. It was shown that the composition of cultivable endophytic bacteria of three bean varieties (BRS Talismã, Ouro Negro and Vermelhinho) grown in an experimental field under the same conditions varies depending on the plant variety (COSTA et al., 2012). In another work, endophytic fungi were isolated and identified in two common bean varieties (Talismã and Ouro Negro) grown in experimental fields as belonging to different genera (GONZAGA et al., 2015). Studies using metagenomics evidenced differences between bacterial populations present in the rhizosphere of distinct bean varieties (MENDES et al., 2018; PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017).

The limited number of studies carried out on the subject until the present reflects in the poor knowledge about the total diversity of endophytic fungi found in distinct organs and in the rhizosphere of different common bean varieties. Furthermore, it is not known about the composition of endophytic fungi present in resistant and susceptible varieties. Therefore, the objective of the present work was to analyze endophytic fungi communities present in several organs of three common bean genotypes, as well as to draw a comparison between the microbiota of these genotypes.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and sample preparation

Three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties were used in the present study, as follows: BRS Talismã, Ouro Negro and Rosinha. The seeds were preliminary disinfested in a solution of 2.5% sodium hypochlorite for 30 min followed by three washes in sterile distilled water and then sown in non-sterile field soil. The soil used was from an experimental field at Universidade Federal de Viçosa – MG. To minimize the environmental effects of the field, the plants were maintained in a greenhouse for 23 days and later four plants of each variety were randomly chosen for DNA extraction. The technical rhizosphere (soil fraction still adhered to the root surface after vigorous agitation) of the selected plants was also collected.

The plants were then separated into organs (root, stem and leaves) and rhizosphere. Each organ was surface disinfested and the epiphytic microorganisms were removed according to the following protocol: 1 min in 70% ethanol followed by 5 min in 2% sodium hypochlorite and three washes with sterile distilled water for leaves and stem. For the roots the sodium hypochlorite step was replaced by 3 min in 3% H₂O₂. A total of 48 samples was collected, 16 of each variety consisting of four samples of each organ (root, stem and leaves) and four rhizosphere samples.

DNA extraction and sequencing

DNA was extracted from the plant organs using the kit NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany), while the kit NucleoSpin® Soil (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) was used to extract DNA from the rhizosphere. In both cases the manufacturer's instructions were followed. The ITS1 region was amplified

using ITS1F (GARDES; BRUNS, 1993) and ITS2 (WHITE et al., 1990) primers and the amplicon sequencing were carried out by the company Argonne National Laboratory (Illinois, USA) using the sequencing platform Illumina MiSeq (2 x 250 pb).

Sequence analysis

The sequences were analyzed with the software USEARCH 8.1 (EDGAR, 2013) and Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010), according to the pipeline developed by the Brazilian Microbiome Project (PYLRO et al., 2014) for the analysis of ITS data produced by Illumina sequencing.

The raw forward reads originated from the sequencing were demultiplexed, filtered by quality (reads with an expected error >0.5 were discarded) and dereplicated. The ITS1 region was isolated using the ITSx software (BENGTSSON-PALME et al., 2013) and trimmed to 140 pb. The operational taxonomic units (OTUs) were grouped considering 97% similarity between the sequences obtained with the Uparse method (EDGAR, 2013). After chimeras were excluded, the taxonomic annotation of the OTUs was carried out based on the UNITE database (KOLJALG et al., 2014). The table showing OTU abundance data was normalized before the subsequent analyses, such as the calculation of alpha and beta diversities. The *Venn* diagrams were drawn with the online tool Jvenn (BARDOU et al., 2014). The reverse reads were not included in the analyses due to their low quality. Species richness and diversity indexes were calculated with the methodology recommended by Chao (CHAO et al., 2014) using the INEXT package for the R software (R CORE TEAM, 2017).

A co-occurrence network was constructed to assess the microbial interactions in the different organs and varieties. For this purpose, SparCC correlations were calculated with the SparCC module available in Python using 100 permutations in the OTU abundance matrix (FRIEDMAN; ALM, 2012). Only the SparCC correlations with absolute values above 0.9 and p-values below 0.01 were included in the network. The IGRAPH package (CSÁRDI; NEPUSZ, 2006) for R (R CORE TEAM, 2017) was used to calculate the network parameters.

RESULTS

A total of 17 313 333 reads were sequenced. The rhizosphere presented the greatest number of reads, followed by leaves, stem and root. After quality filtering 5 935 695 sequences (34.28%) remained in the analyses. The number of reads for each

sample (leaf, stem, root and rhizosphere for each variety) was normalized to 5440 for the downstream comparative analyses.

Alpha and beta diversities

Rarefaction analyses showed that the sampling of the endophytic fungal community was representative and quality would probably have not improved with additional samplings (Fig. S1). The coverage value was higher than 97% for all samples, evidencing that the sampling was good enough to determine most of the fungal diversity existing in the plant organs and in the rhizosphere. The number of OTUs detected in the leaf, stem, root and rhizosphere for each variety varied from 55 to 428 (Table S1). The rhizosphere presented a significantly higher number of OTUs than stem, leaf and root samples for all three varieties (Fig. 1). The values of diversity indices were similar among varieties for the same organ and among different organs of the same variety.

According to the principal coordinates analysis (PCoA), the endophytic fungal community found in the root was similar among the varieties but different from the rhizosphere and other plant organs (Fig. 2a). The same occurred in the rhizosphere. On the other hand, the fungal community found in the leaves was similar to stem. The fungal composition of the plant organs and the rhizosphere did not differ among the common bean varieties (Fig. 2b).

Endophytic fungal communities present in organs and in the rhizosphere of the common bean varieties

Based on the analysis of ITS1 amplicons, the phyla Ascomycota, Basidiomycota and Mortierellomycota were the most abundant among the common bean endophytes (Fig. S2). In the leaf, stem and rhizosphere samples the phylum Ascomycota predominated, comprising between 23 and 74% of the microorganisms found. Only in the stem samples of all three varieties and in the leaf samples of the Rosinha variety the phylum Basidiomycota was more abundant, representing from 16 to 40% of the total. In turn, in root samples approximately 90% of the detected sequences belonged to the phylum Mortierellomycota.

The most abundant Ascomycota classes in leaf, stem and rhizosphere samples were Sordariomycetes and Dothideomycetes, while the Basidiomycota was represented mainly by Agaricomycetes (Fig. 3). The class Sordariomycetes was

predominant in the rhizosphere, whereas the class Dothideomycetes predominated in stem and leaf samples. The Agaricomycetes class was more abundant in stem samples. In root samples, about 90% of the samples were identified as Mortierellomycotina (*Incertae sedis*).

The identified OTUs were attributed to 283 genera. The number of OTUs among the varieties was similar, 195 (69%) were shared among all three varieties and few taxa were unique to each plant variety (Fig. 4a and Table S2). The five most abundant genera present in the plant organs and in the rhizosphere varied between the common bean varieties (Fig. S3). At least 76 genera of fungi were detected in the leaves, with the more abundant being *Rhamularia* (22%), *Mortierella* (19%), *Fusarium* (6%) and *Cladosporium* (5%). The *Colletotrichum* OTU found in stem and leaf samples of the Rosinha (susceptible) and in one stem sample of the Ouro Negro (resistant) variety was identified as belonging to *C. lindemuthianum*, a species known to cause anthracnose in common bean plants. At least 16% of the genera identified in the three varieties were shared among the plant organs and the rhizosphere (Fig. 4b). The rhizosphere of all varieties presented the largest number of unique genera, and roots the smallest. Unique genera were found in the different organs and in the rhizosphere of all three common bean varieties (Fig. 4c).

Structure of the interaction network of endophytic fungi in the different organs

The co-occurrence network was analyzed to evaluate the number of interactions of endophytic fungi present in the plant organs and in the rhizosphere of the distinct plant varieties. This number was larger in the rhizosphere than in the plant organs, except for the leaves of the Ouro Negro variety, which presented the largest number of interactions (Table 1). Curiously, the roots of this same variety exhibited a lower number of interactions compared to the other varieties.

Positive interactions predominated in the organs of the aerial part in all varieties, whereas in the roots the number of positive and negative interactions was similar to that observed in the rhizosphere (Table 1). The average length and diameter of the network referent to the organs of the aerial part of the Ouro Negro and BRS Talismã varieties was larger than Rosinha. The modularity of the aerial part organs in the Ouro Negro and BRS Talismã varieties was smaller than Rosinha. The average degree, which consists of the average number of interactions established by each OTU, was

considerably higher in the Ouro Negro leaves, indicating an elevated interdependency between the OTUs.

DISCUSSION

This work was the first to investigate the endophytic fungal community in different plant organs and rhizosphere of three common bean varieties, where a wide diversity of endophytic fungi was found. The diversity index values varied between the plant organs and rhizosphere. Among the organs, the highest diversity was observed in the leaves. A study evaluating the fungal microbiome of strawberry plants showed similar results, with the highest alpha and beta indexes found in the leaves when compared with the other organs of the aerial part. In addition, the mycobiota composition in leaves was different from other organs of the same plant (ABDELFAH et al., 2016). The rhizosphere presented the highest indexes, probably due to the fact that soil microbiota is complex and these microorganisms are attracted by root exudates (HUANG et al., 2014). It has already been shown that the host genotype may affect the endophytic microbiota (WAGNER et al., 2016). In common bean plants the mycobiota composition seems to vary not only with the variety but also with plant organ. In other studies, difference in mycobiota composition among organs of the same variety and difference in mycobiota composition of a single organ in different genotypes was observed (ABDELFAH et al., 2016; BÁLINT et al., 2013). Endophytes in the roots and in the rhizosphere form groups different than stem and leaves, which share the mycobiota.

In the vegetal samples we found mainly members of the phyla Ascomycota, Basidiomycota and Mortierellomycota. Ascomycota representatives were more abundant in the aerial plant organs, corroborating the findings of another work in which endophytic fungi present in the aerial parts of common bean plants also belonged to the referred phylum (GONZAGA et al., 2015). Certain classes of endophytic fungi predominate in several plants (ARNOLD; LUTZONI, 2007; HIGGINS et al., 2007). Two of them, Dothideomycetes and Sordariomycetes, were the most abundant in the aerial part of the common bean plants. The phylum Basidiomycota has been detected mainly in the stem of common bean varieties. Endophytic fungi belonging to this phylum are more often found in stem tissues, while Ascomycota fungi can be detected both in leaves and in stem (ARNOLD, 2007). The phylum Mortierellomycota comprises fungi of the subphylum Mortierellomycotina, which have been described as saprophytic soil

inhabitants (HOFFMANN; VOIGT; KIRK, 2011). Fungi of the Mortierellomycotina genus *Mortierella* have already been reported in studies on microbiome (ALMARIO et al., 2017) and as endophytic microorganisms (MELO et al., 2014; PERŠOH, 2013). Although common beans can perform symbiosis with mycorrhizal fungi (ABDEL-FATTAH et al., 2011), interestingly, no Glomeromycota was detected in none of the rhizosphere or common bean root samples. The same was observed in cormosphere, rhizosphere and bulk soil during dormant stage and flowering *Crocus sativus* (AMBARDAR et al., 2016). A possible cause is the absence of phylum in the samples or the primers used. Primers for the ITS region are not the most suitable and/or used for Glomeromycota, as well as the UNITE database for taxonomic information of this group (LEE; LEE; YOUNG, 2008; LINDAHL et al., 2013).

In previous studies using isolation to evaluate the common bean endophytic communities, only 27 fungal genera were identified in leaves of plants at 45 days of cultivation on experimental fields. The genera *Colletotrichum*, *Cochliobolus*, *Hannaella* and *Phomopsis* predominated (GONZAGA et al., 2015). However, in a cultivation-independent analysis of the common bean microbiome, the abundance of these genera was relatively low (0.1%). In some samples they could not even be detected. Nevertheless, up to date there are no reports of endophytic *C. lindemuthianum* being isolated from common bean plants. Interestingly, an analysis of the microbiome found in strawberry plants revealed a single representative of the *Colletotrichum* genus, the *C. acutatum* fungus, which causes anthracnose in that same crop (ABDEL-FATTAH et al., 2016). The pathogenic fungus *Ustilago maydis*, causal agent of the corn smut, has been detected in the community of both resistant and susceptible maize plants (PAN; BAUMGARTEN; MAY, 2008).

The common bean varieties were grown under controlled conditions for the microbiome analysis, therefore the absence of other genera reported in the literature may have been associated to the place of cultivation. The majority of studies on endophyte diversity, such as that by Gonzaga *et al.* (2015), are carried out on plants grown under field conditions, in which fungal propagation occurs mainly by rain and wind that carry out the spores. In greenhouses these factors are absent. Furthermore, the common bean plants collected were young, and studies on leaf endophytes showed that older leaves present a higher diversity of fungal endophytes due to their longer exposition to environmental factors, which increase the chance of spore deposition and the consequent colonization by fungi present in the environment

(LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017). The endophytic fungal species detected in the present study either already existed on the seeds used or in the soil and then colonized the plants, considering that many endophytic species can also be vertically propagated (RODRIGUEZ et al., 2009).

The large number of genera identified in our work corroborates the higher capacity of microorganism detection in the endophytic microbiota based on ITS1 amplicons. When isolation techniques are used, the presence and the relative abundance of a certain species may be associated with its ability to grow and develop on specific culture medium or cultivation conditions in the laboratory (HYDE; SOYTONG, 2008). The use of the ITS1 or ITS2 region for diversity studies using high-throughput sequencing is widely employed, with either of the two regions being sufficient to study the fungal diversity of environmental samples (MONARD; GANTNER; STENLID, 2013).

Interaction networks of fungal endophytes were constructed for distinct plant organs. These co-occurrence networks evidenced that in the organs of the aerial part there were more positive than negative interactions, reflecting a possibly stronger functional dependency between the species. Curiously the Ouro Negro variety, which was resistant to anthracnose, showed a large number of interactions in the leaves when compared to the Rosinha variety (susceptible) considering the same organ. The abundant interactions together with the high fungal diversity may represent crucial features in the resistance of the variety to that disease (LATZ et al., 2012). However, the average length and the diameter exhibited higher values, and the modularity values were smaller for the interaction network observed in the aerial part organs of the Ouro Negro and BRS Talismã varieties, suggesting a less connected community (MENDES et al., 2018; NEWMAN, 2006).

The present study on the diversity of endophytic fungi existing in common bean plants evidenced that the presence of certain fungi depends much more on the plant organ than on the variety itself. Microbiome studies are important as they generate knowledge that may help answer questions arising along the study. For example, if in the cases where fungal genera are shared among plant varieties it means that there exists a minimal mycobiota for a certain species. The same applies to the cases where genera specific of a given plant variety could be involved in the differential response to biotic or abiotic stresses, or even resistance to plant pathogens. If the presence of phytopathogenic fungi in plant varieties considered resistant indicate that these fungi

are in a latent stage or living as endophyte. This way, we could try to understand and elucidate processes taking place in the interactions among these microorganisms and their host plants as well as the response of these plants to environmental conditions. We can also direct future studies by focusing on these issues that are raised.

LITERATURE CITED

1. Petrini O (1991) Fungal endophytes of tree leaves. *In: Microbial Ecology of Leaves*. pp 179–197
2. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182:314–330 . doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
3. Haroim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320 . doi: 10.1128/MMBR.00050-14
4. Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291–315 . doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081831
5. Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88:541–549 . doi: 10.1890/05-1459
6. Ding X, Liu K, Deng B, et al (2013) Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1831–1838 . doi: 10.1007/s11274-013-1345-x
7. Müller H, Berg C, Landa BB, et al (2015) Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Front Microbiol* 6:1–9 . doi: 10.3389/fmicb.2015.00138
8. Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL, et al (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci Rep* 6:28774 . doi: 10.1038/srep28774
9. Ambardar S, Singh HR, Gowda M, Vakhlu J (2016) Comparative metagenomics reveal phylum level temporal and spatial changes in mycobiome of belowground parts of *Crocus sativus*. *PLoS One* 11:1–17 . doi: 10.1371/journal.pone.0163300
10. Abdelfattah A, Wisniewski M, Giulia M, Destri L (2016) Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. *PLoS One* 11:1–18 . doi:

10.1371/journal.pone.0160470

11. Bálint M, Tiffin P, Hallström B, et al (2013) Host genotype shapes the foliar fungal microbiome of balsam poplar (*Populus balsamifera*). PLoS One 8: . doi: 10.1371/journal.pone.0053987
12. Mashiane RA, Ezeokoli OT, Adeleke RA (2017) Metagenomic analyses of bacterial endophytes associated with the phyllosphere of a Bt maize cultivar and its isogenic parental line from South Africa. World J Microbiol Biotechnol 33:1–12 . doi: 10.1007/s11274-017-2249-y
13. Costa LE de O, de Queiroz MV, Borges AC, et al (2012) Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Braz J Microbiol 43:1562–75 . doi: 10.1590/S1517-838220120004000041
14. Gonzaga LL, Costa LEO, Santos TT, et al (2015) Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. J Appl Microbiol 118:485–496 . doi: 10.1111/jam.12696
15. Pérez-jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M, et al (2017) Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. Nat Publ Gr 1–14 . doi: 10.1038/ismej.2017.85
16. Mendes LW, Raaijmakers JM, De Hollander M, et al (2018) Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. ISME J 12:212–224 . doi: 10.1038/ismej.2017.158
17. GARDES M, BRUNS TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2:113–118 . doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
18. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. Elsevier, pp 315–322
19. Edgar RC (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nat Methods 10:996–998 . doi: 10.1038/nmeth.2604
20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. Nat Publ Gr 7:335–336 . doi: 10.1038/nmeth0510-335
21. Pylro VS, Roesch LFW, Ortega JM, et al (2014) Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity-challenges and prospects. Microb Ecol 67:237–241 . doi: 10.1007/s00248-013-0302-4
22. Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, et al (2013) Improved software

- detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol* 4:914–919 . doi: 10.1111/2041-210X.12073
23. Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al (2014) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol* 22:5271–5277 . doi: 10.1111/mec.12481
 24. Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al (2014) jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15:293 . doi: 10.1186/1471-2105-15-293
 25. Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, et al (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr* 84:45–67 . doi: 10.1890/13-0133.1
 26. R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing
 27. Friedman J, Alm EJ (2012) Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput Biol* 8:1–11 . doi: 10.1371/journal.pcbi.1002687
 28. Csárdi G, Nepusz T (2006) The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Syst* 1695:1–9 . doi: 10.3724/SP.J.1087.2009.02191
 29. Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, et al (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities ¹. *Botany* 92:267–275 . doi: 10.1139/cjb-2013-0225
 30. Wagner MR, Lundberg DS, Del Rio TG, et al (2016) Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nat Commun* 7:1–15 . doi: 10.1038/ncomms12151
 31. Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, et al (2007) Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Mol Phylogenet Evol* 42:543–555 . doi: 10.1016/j.ympev.2006.07.012
 32. Arnold AE (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev* 21:51–66 . doi: 10.1016/j.fbr.2007.05.003
 33. Hoffmann K, Voigt K, Kirk PM (2011) *Mortierellomycotina*; subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. *Mycotaxon* 115:353–363 . doi: 10.5248/115.353
 34. Almario J, Jeena G, Wunder J, et al (2017) Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proc Natl Acad Sci* 201710455 . doi: 10.1073/pnas.1710455114
 35. Peršoh D (2013) Factors shaping community structure of endophytic fungi-evidence from the Pinus-Viscum-system. *Fungal Divers* 60:55–69 . doi:

10.1007/s13225-013-0225-x

36. Melo IS, Santos SN, Rosa LH, et al (2014) Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* 18:15–23 . doi: 10.1007/s00792-013-0588-7
37. Abdel-Fattah GM, El-Haddad SA, Hafez EE, Rashad YM (2011) Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol Res* 166:268–281 . doi: 10.1016/j.micres.2010.04.004
38. Lee J, Lee S, Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65:339–349 . doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x
39. Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L, et al (2013) Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New Phytol* 199:288–299 . doi: 10.1111/nph.12243
40. Pan JJ, Baumgarten AM, May G (2008) Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). *New Phytol* 178:147–156 . doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02350.x
41. López-González RC, Gómez-Cornelio S, De la Rosa-García SC, et al (2017) The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecol* 26:1–10 . doi: 10.1016/j.funeco.2016.11.004
42. Hyde KD, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163–173
43. Monard C, Gantner S, Stenlid J (2013) Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 84:165–175 . doi: 10.1111/1574-6941.12046
44. Latz E, Eisenhauer N, Rall BC, et al (2012) Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities. *J Ecol* 100:597–604 . doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01940.x
45. Newman MEJ (2006) Modularity and community structure in networks. *Proc Natl Acad Sci* 103:8577–8582 . doi: 10.1073/pnas.0601602103

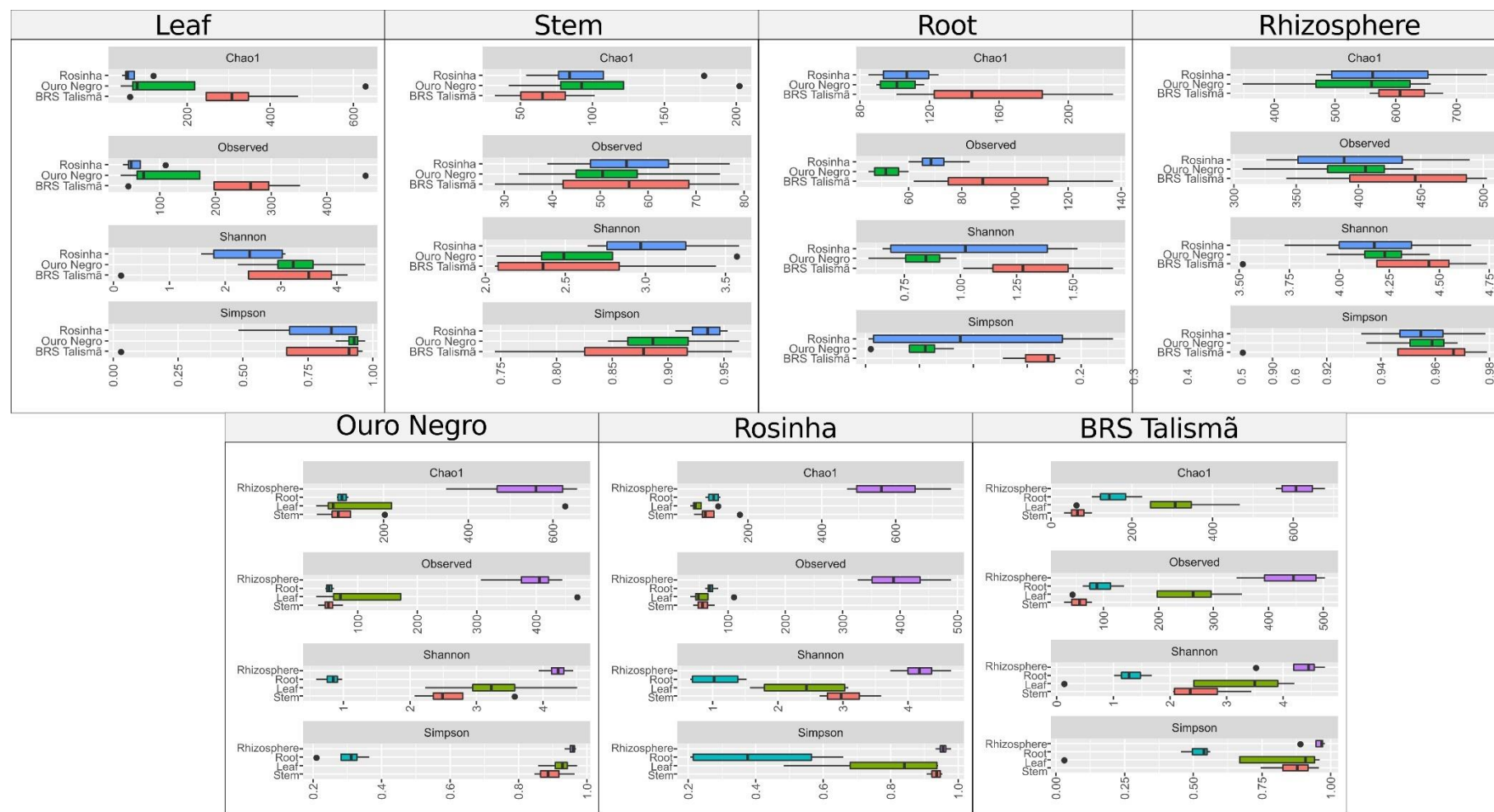


Fig. 1 Species richness and diversity in the different organs and in the rhizosphere of the common bean varieties Ouro Negro, Rosinha and BRS Talismã.

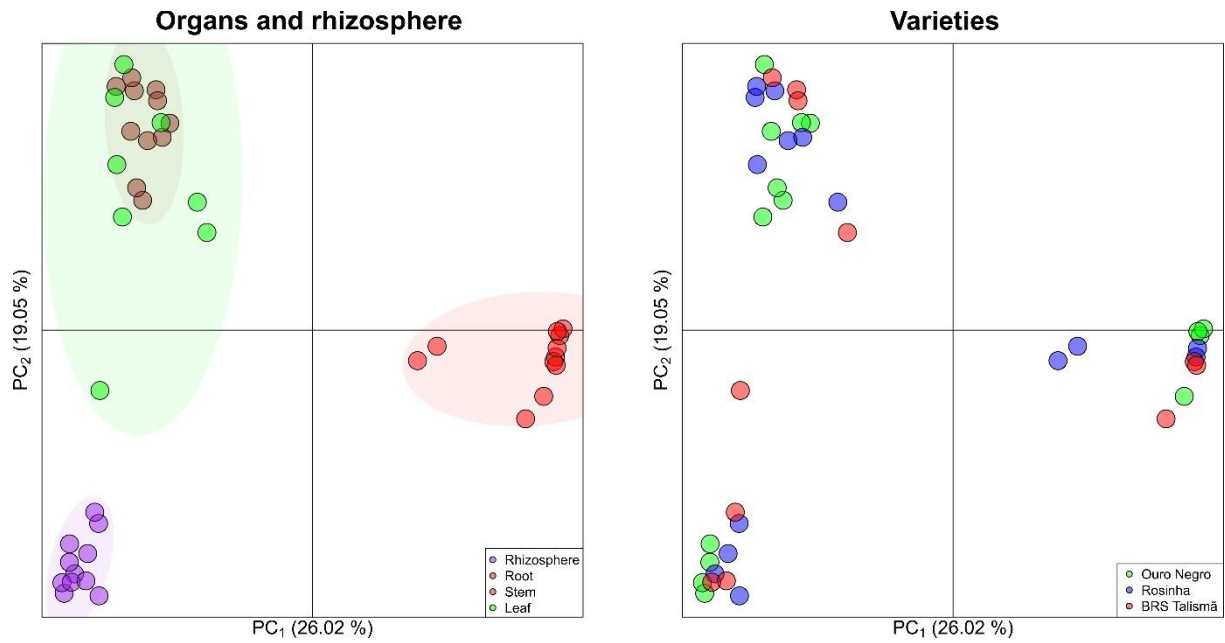


Fig. 2 Principal coordinates analysis (PCoA) based on the Bray-Cutis distance matrix showing the beta diversity for organs and rhizosphere samples (A) and the different varieties (B). Ellipses represent a confidence interval of 95%.

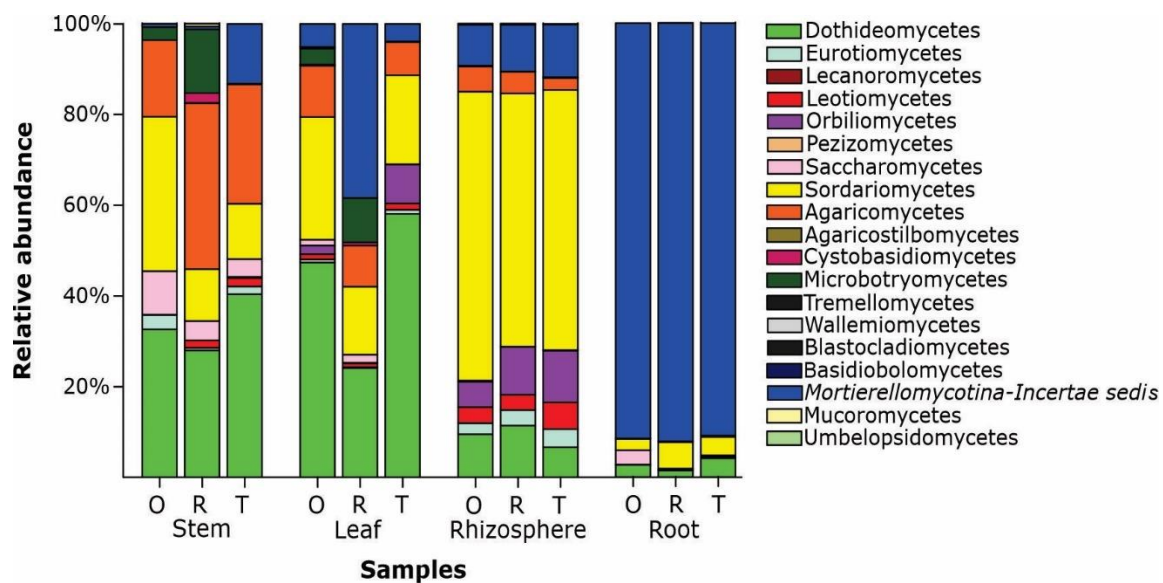


Fig. 3 Relative abundance of the phyla detected in the organs and rhizosphere samples of three common bean varieties (O: Ouro Negro; R: Rosinha; T: BRS Talismã)

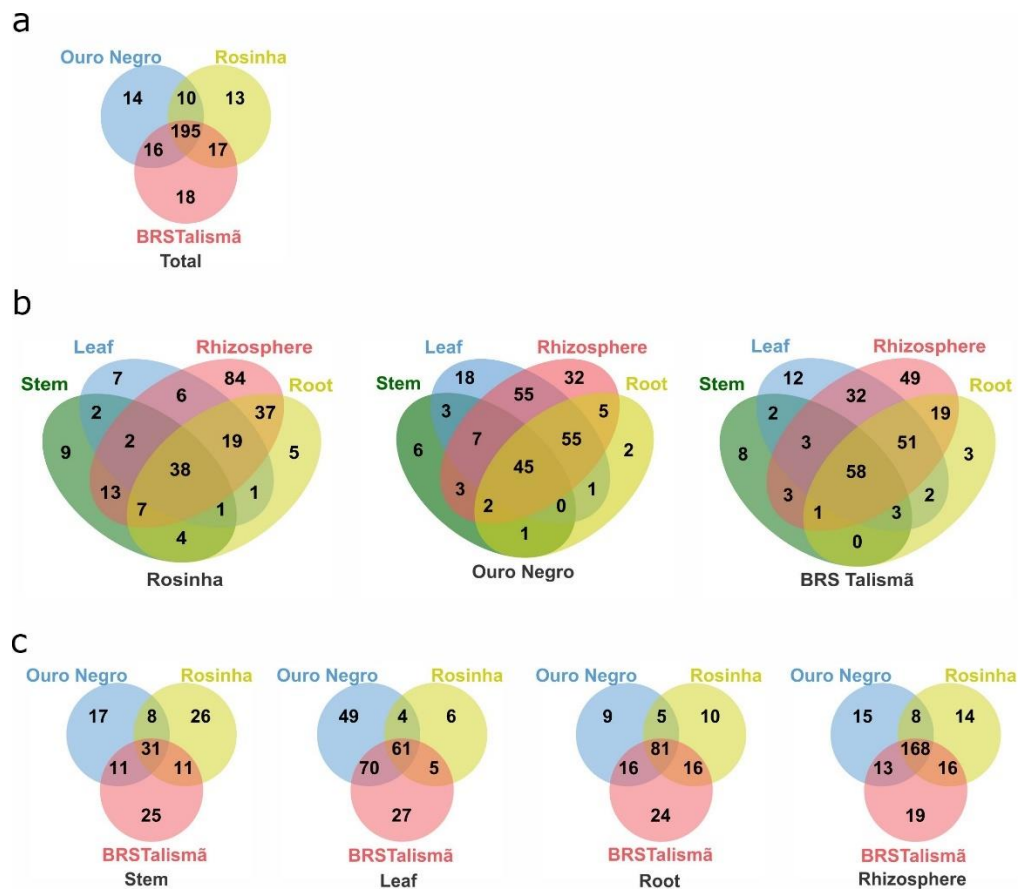
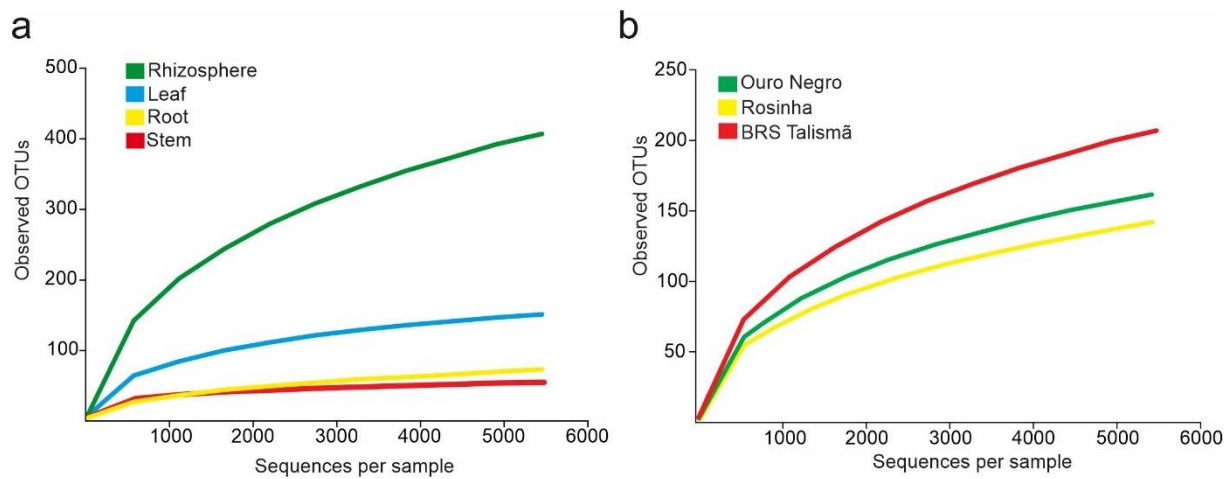
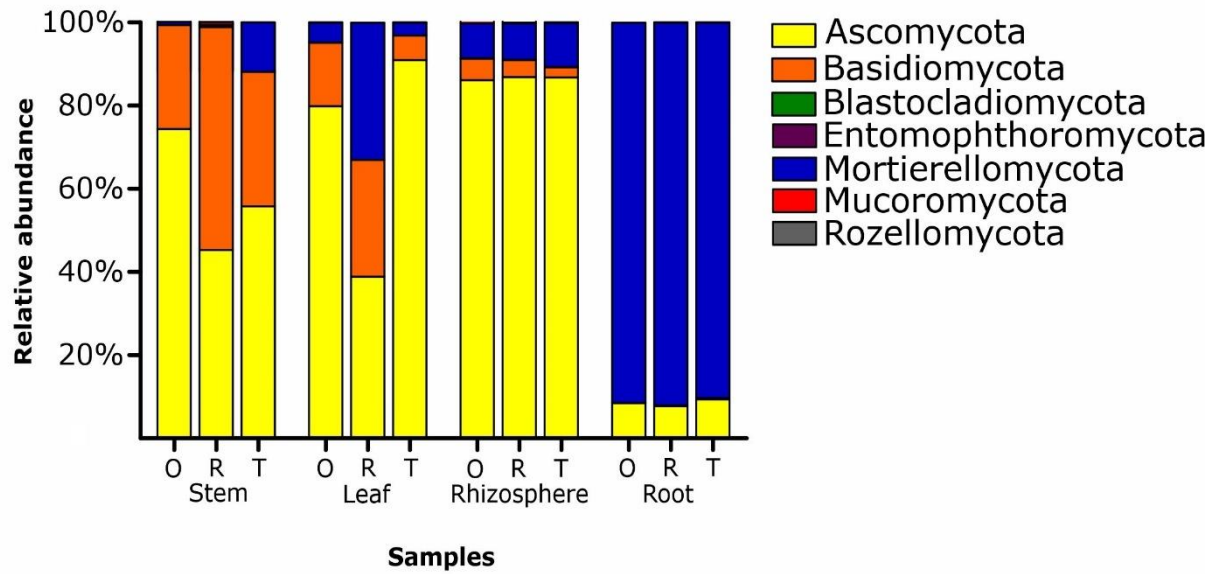


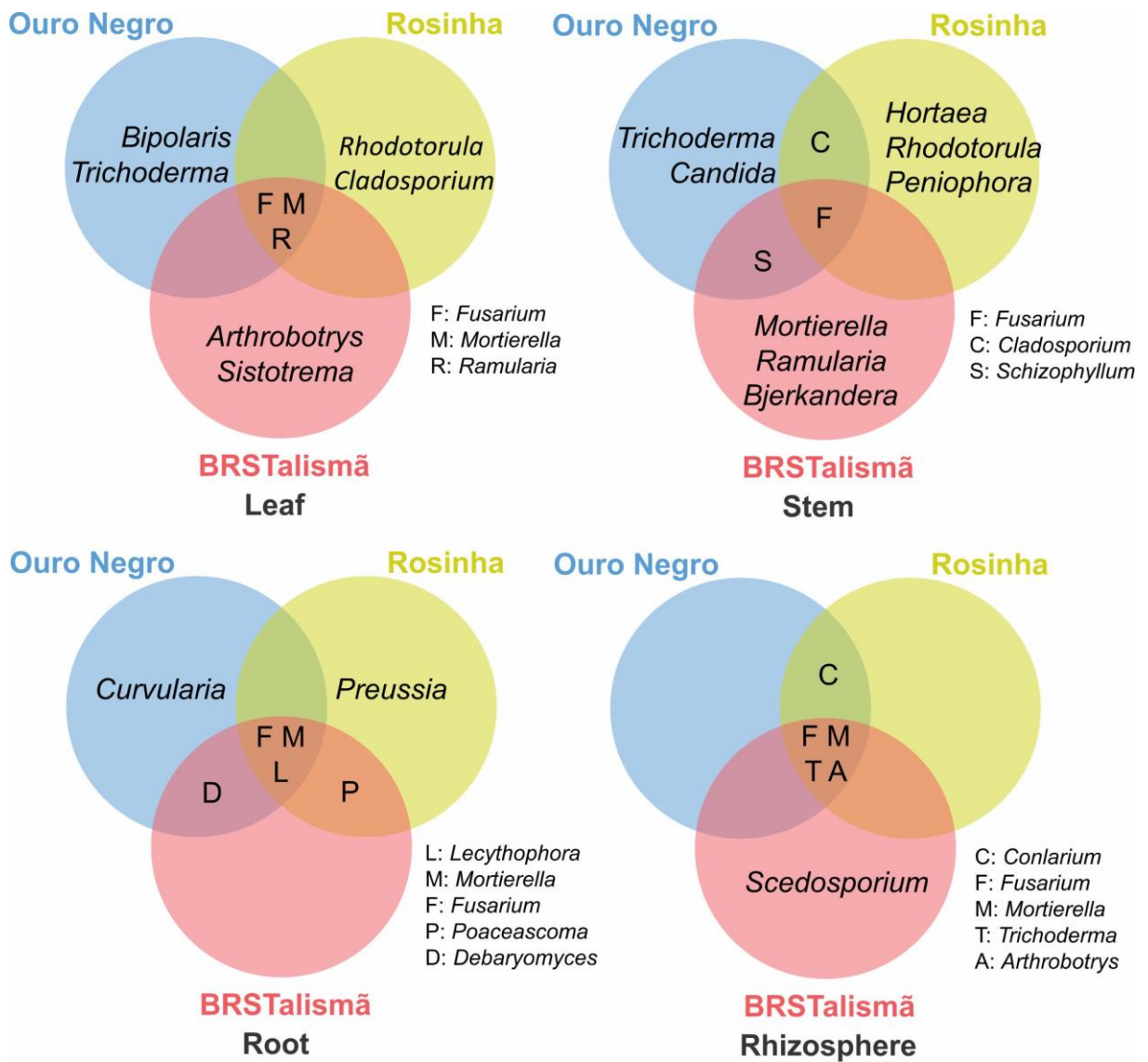
Fig 4 Venn diagrams showing the number of genera shared (A) for the distinct varieties, (B) for the plant organs and the rhizosphere of each variety and (C) for the same plant organ or rhizosphere between the different varieties



Supplementary Figure 1. Rarefaction curve. a: For plant organs and rhizosphere samples. b: For different common bean varieties.



Supplementary Figure 2. Relative abundance of taxonomic classes found in organs and rhizosphere samples of three common bean varieties. O: Ouro Negro; R: Rosinha; T: BRS Talismã.



Supplementary Figure 3. Five most abundant genera in each variety by organs and rhizosphere.

Table 1. Features of the co-occurrence network in the distinct organs and in the rhizosphere of three common bean varieties.

Parameters	Variety	Samples			
		Leaf	Stem	Root	Rhizosphere
Number of nodes	Ouro Negro	176	52	14	755
	Rosinha	57	73	40	770
	BRS Talismã	64	67	46	826
Number of interactions	Ouro Negro	1347	101	13	1103
	Rosinha	90	101	116	881
	BRS Talismã	107	116	96	941
Number of positive interactions	Ouro Negro	1091 (81%)	84 (83%)	6 (46%)	600 (54%)
	Rosinha	78 (87%)	91 (90%)	60 (52%)	460 (52%)
	BRS Talismã	95 (89%)	105 (90%)	52 (54%)	524 (55%)
Number of negative interactions	Ouro Negro	256 (19%)	17 (17%)	7 (54%)	503 (46%)
	Rosinha	12 (13%)	10 (10%)	56 (48%)	421 (48%)
	BRS Talismã	12 (11%)	11 (10%)	44 (46%)	417 (44%)
Modularity	Ouro Negro	0.62	0.67	0.56	0.57
	Rosinha	0.80	0.79	0.23	0.55
	BRS Talismã	0.63	0.63	0.31	0.58
Diameter	Ouro Negro	8	6	4	8
	Rosinha	7	6	7	9
	BRS Talismã	8	7	7	8
Average length	Ouro Negro	3.22	2.28	1.98	3.66
	Rosinha	2.69	1.95	2.69	3.67
	BRS Talismã	2.74	2.58	2.84	3.80
Average degree	Ouro Negro	7.65	1.94	0.93	1.46
	Rosinha	1.58	1.38	2.90	1.14
	BRS Talismã	1.67	1.73	2.09	1.14

Supplementary Table 1. Number of operational taxonomic units (OTUs), coverage and diversity indexes for the different samples and the number of sequences utilized

Samples ^a	Sequence s	Observed OTUs	Coverage
TR	5442	428.25	0.971
OR	5442	397	0.974
RR	5442	393.75	0.971
TL	5442	234.5	0.987
OL	5442	166	0.989
RL	5442	62	0.998
TZ	5442	94.33	0.993
OZ	5442	50.75	0.996
RZ	5442	72.75	0.995
TS	5442	56.5	0.998
OS	5442	53	0.997
RS	5442	53	0.998

^aOS: Ouro Negro stem, RS: Rosinha stem, TS: BRS Talismã stem, OL: Ouro Negro leaf, RL: Rosinha leaf, TL: BRS Talismã leaf, OR: Ouro Negro rhizosphere, RR: Rosinha rhizosphere, TR: BRS Talismã rhizosphere, OZ: Ouro Negro root, RZ: Rosinha root, TZ: BRS Talismã root.

Supplementary Table 2. Taxa unique to each common bean variety

Plant variety	OTU ID	Taxon
Rosinha	OTU23945348119418	Campylocarpon
	OTU18079492835682	Exidia
	OTU53204321913386	Fomitopsidaceae
	OTU76028825673472	Periconia
	OTU98994546346506	Volvariella
	OTU61668953039148	Xenasma
	OTU47583106291577	Buckleyzyma
	OTU91877762441847	Coniochaetales
	OTU6784747006221	Euteratosphaeria
	OTU9423560255616	Mycosphaerellaceae
	OTU97210364353460	Onygenales
	OTU77613449950509	Rachicladosporium
	OTU92212618842674	Valsaceae
Ouro Negro	OTU45804324286849	Botryobasidiaceae
	OTU67666342798088	Cytospora
	OTU12877847770785	Deconica
	OTU33141586077870	Entoloma
	OTU71941311692985	Kwoniella
	OTU14351570567594	Saccharomycetales
	OTU28139254881180	Trematosphaeria
	OTU74986726745926	Waitea
	OTU62439765859098	Agaricales
	OTU36335625120657	Lecanoromycetes
	OTU97653361023451	Noosia
	OTU89051821906744	Pseudorobillarda
	OTU17708021048916	Teratosphaericola
OTU11376956386042	Xenocamarosporium	
BRS Talismã	OTU28763574249354	Amyloxenasma
	OTU46524173051852	Barnettozyma
	OTU55650914974102	Basidioascus
	OTU44062209874780	Catenulostroma
	OTU25997808631996	Flavodon
	OTU31514521068959	Helicosporium
	OTU18693144298897	Humicola
	OTU6975657083788	Neodeightonia
	OTU67244453469671	Neurospora
	OTU27351723700363	Paraconiothyrium
	OTU84571115143243	Phialemonium
	OTU92731704569401	Sclerotinia
	OTU78891900325874	Subulicystidium
	OTU71537817214853	Talaromyces
	OTU26739740305613	Eupeniidiella
OTU44450645467822	Meripilaceae	
OTU24796895205963	Meruliaceae	
OTU23738461389768	Xylariales	

Capítulo 2

O arsenal pectinolítico de *Colletotrichum lindemuthianum* e de outros fungos com diferentes estilos de vida

O arsenal pectinolítico de *Colletotrichum lindemuthianum* e de outros fungos com diferentes estilos de vida

Leandro L. da Silva^a; Túlio Morgan^b; Ediones Amaro Garcia^a; Rafael de Oliveira Rosa^a; Tiago Antônio de Oliveira Mendes^b; Marisa V. de Queiroz^{a*}.

^aDepartamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

*E-mail: mvqueiro@ufv.br; Tel.: +55-31-3612-2451.

RESUMO

A pectina é um dos principais componentes da parede celular vegetal e diversos fungos apresentam enzimas envolvidas na degradação da pectina, que auxiliam na colonização do hospedeiro e na aquisição de nutrientes oriundos de material vegetal. Para os fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose em *Phaseolus vulgaris*, as pectinases são consideradas importantes fatores de virulência. Devido a importância dessas enzimas foram identificados e analisados genes que codificam pectinases no genoma do fungo *C. lindemuthianum*. Além disso, foi analisada a expressão desses genes; foram comparadas as pectinases de *C. lindemuthianum* com as pectinases de outros fungos do gênero *Colletotrichum* e com fungos de diferentes estilos de vida e foi determinada a atividade de pectinases em alguns desses fungos. O fungo *C. lindemuthianum* apresenta 58 genes que codificam pectinases, pelo menos seis tipos de enzimas envolvidas na degradação da pectina, sendo as pectato liases e poligalacturonases as mais abundantes. A maioria dos genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* apresentam em sua região promotora sítios de ligação para diferentes fatores transcricionais. Quarenta e sete genes apresentam introns, variando em números de um a dez. Aproximadamente 80% das pectinases putativas apresentaram sítios para N-glicosilação, presença de peptídeo sinal e diferentes pontos isoelétricos.

Algumas pectinases putativas apresentaram mais de um domínio. Vinte e sete genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* são diferencialmente expressos em algum momento na interação com o seu hospedeiro. Para cada tipo de pectinase de *C. lindemuthianum* existem pelo menos três grupos de isoenzimas. O número de genes que codificam pectinases presentes no genoma de fungos com diferentes estilos de vida parece estar mais relacionado com o estilo de vida apresentado do que com a relação taxonômica entre eles. As pectinases são mais abundantes em fungos considerados necrotróficos e hemibiotróficos. Dos fungos utilizados para a dosagem de atividade de pectinases, somente os fungos fitopatogênicos apresentaram atividade de pectato liase. As atividades de poligalacturonase e de pectina liase foram semelhantes entre os fungos fitopatogênicos e oportunistas analisados. As pectinases apresentam-se importantes principalmente para os fungos fitopatogênicos, como o fungo *C. lindemuthianum*, visto a maior quantidade e diversidade de genes que codificam para essas enzimas encontradas nos seus genomas; a expressão desses genes durante a interação com o hospedeiro e a detecção de atividade dos três tipos de pectinases avaliadas.

Palavras-chave: pectinases; enzimas pectinolíticas; pectina liase; pectato liase; poligalacturonase.

INTRODUÇÃO

A parede celular das plantas é uma estrutura composta principalmente por celulose, hemicelulose e pectina (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Os fungos em geral produzem enzimas envolvidas na degradação desse material vegetal. Por exemplo, alguns fungos fitopatogênicos no processo de colonização e estabelecimento da doença secretam uma série de enzimas como as celulasas, hemicelulasas e pectinases que auxiliam na maceração do tecido do hospedeiro (YARULLINA; AKHATOVA; KASIMOVA, 2016).

Um dos componentes mais abundantes na parede celular é a pectina. O seu percentual e composição variam de acordo com a espécie e o tipo de tecido vegetal (VINCKEN et al., 2003). A pectina é considerada um polímero complexo, constituída de diferentes monômeros e para sua completa degradação várias

enzimas estão envolvidas. Enzimas como pectina liase, pectato liase, poligalacturonase e rhamnogalacturonase (rhamnogalacturonana liase ou hidrolase) podem atuar na cadeia principal da pectina, composta por ácido poligalaturônico e/ou ramnose liberando os monômeros que compõem a cadeia principal (DUBEY et al., 2016; GLASS et al., 2013). Algumas enzimas atuam removendo grupos metil ou acetil presentes na cadeia principal da pectina, como pectina metilesterases e acetilesterases (DUBEY et al., 2016). Outras enzimas atuam nas ramificações presentes na cadeia principal para remover as xiloses, galactoses, arabinofuranose e outros monômeros que possam estar associados a pectina (GLASS et al., 2013).

As enzimas pectinolíticas têm se mostrado importantes para os fungos fitopatogênicos. Em diversos fitopatógenos, essas enzimas são consideradas fatores de virulência e essenciais para o desenvolvimento da doença (SCHMITZ et al., 2019). Em fungos do gênero *Colletotrichum*, por exemplo, foi demonstrado que enzimas pectinolíticas são importantes na interação do fungo com o seu hospedeiro. Foi verificado em abacate que a atividade de pectato liase nos tecidos do fruto colonizados por *Colletotrichum gloeosporioides* aumentava ao longo do tempo, assim como as lesões da doença (WATTAD et al., 1997). Em *Colletotrichum coccodes* foi observado que isolados mais agressivos secretavam pectato liase antes do que os isolados de agressividade média (BEN-DANIEL; BAR-ZVI; TSROR LAHKIM, 2012).

O fungo *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) é um ascomiceto com estilo de vida hemibiotrófico, conhecido por causar redução de produtividade na cultura do feijoeiro-comum (SHARMA et al., 2008). Esse patógeno causa a doença conhecida como antracnose, que afeta diversos órgãos do hospedeiro. Durante o seu processo de infecção, o fungo inicialmente coloniza o hospedeiro com hifas primárias sem causar morte celular, obtendo seus nutrientes das células hospedeiras vivas. Esse estágio assintomático de infecção é denominado biotrófico (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Após a fase biotrófica, o fungo muda para a fase necrotrófica. Nesta fase, hifas secundárias emergem das hifas primárias e invadem células vizinhas à célula inicialmente infectada, matando-as e degradando a parede celular para prosseguir a infecção (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Diferentes enzimas pectinolíticas têm sido estudadas em *C. lindemuthianum*. Dois genes que codificam

poligalacturonases identificados em *C. lindemuthianum*, *clpg1* e *clpg2*, apresentaram perfis de expressão diferentes, sendo estes relacionados com as fases de infecção do fungo. Somente para o gene *clpg1* foram detectado transcritos no início da fase necrotrófica e a proteína Clpg1 foi identificada por anticorpos em lesões nos tecidos da planta (CENTIS et al., 1997). A análise da expressão do gene *clpn12*, que codifica uma pectina liase, em uma raça patogênica e outra não patogênica de *C. lindemuthianum* revelou diferenças significativas na expressão desse gene quando as duas raças foram cultivadas em diferentes fontes de carbono (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Em *C. lindemuthianum* a inativação de um gene que codifica uma pectato liase (*pecC1*) levou a redução dos sintomas da doença apresentados pelo feijoeiro-comum (CNOSSEN-FASSONI et al., 2013).

Igualmente aos fungos fitopatogênicos, outros fungos apresentam um ou mais de um tipo de pectinases que favorecem a exploração de carbono de diferentes ambientes (BENOIT et al., 2012). Várias espécies de fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de crescer em meios contendo pectinas de diferentes origens, demonstrando a capacidade desses fungos de utilizar a pectina como fonte de carbono (BENOIT et al., 2012). Além do papel relacionado a nutrição dos fungos, as enzimas pectinolíticas produzidas por micro-organismos são bastante utilizadas em diferentes setores da indústria (GARG et al., 2016). Nesse sentido, diferentes espécies de fungos são exploradas buscando-se obter produção de determinadas pectinases de interesse. Por exemplo, fungos isolados de diferentes ambientes foram selecionados para a produção de poligalacturonases (PHUTELA et al., 2005), a triagem de fungos do gênero *Aspergillus* para a produção de pectato liase (KAMIJO et al., 2019), a utilização de *Fusarium oxysporum* para a produção de pectina liase (YADAV et al., 2017) para diferentes aplicações na indústria.

Dezenas de genomas de fungos ascomicetos e basidiomicetos, assim como de micro-organismos oomicetos vêm sendo sequenciados e as sequências disponibilizadas nos bancos de dados e entre estas, as sequências do genoma de isolados do fungo *C. lindemuthianum*. Uma análise comparativa de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal presentes no genoma de dezenas de fungos mostrou que estes exibem uma enorme diversidade no número e variedade dessas enzimas (ZHAO et al.,

2013b). Mesmo fungos que não apresentam relação íntima com as plantas, como parasitas de insetos possuem em seu genoma, genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de parede celular vegetal (ZHAO et al., 2013b). Assim, analisando o genoma de diferentes fungos é possível identificar genes que codificam grupos de enzimas de interesse agrícola e/ou biotecnológico.

Devido a importância das pectinases, os principais objetivos desse trabalho foram identificar e analisar genes que codificam pectinases no genoma do fungo *C. lindemuthianum*; avaliar a expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum*; comparar as pectinases putativas encontradas em *C. lindemuthianum* com as pectinases produzidas por fungos do gênero *Colletotrichum*. Adicionalmente, foram comparadas as pectinases encontradas no genoma de fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida e foram determinadas as atividades de pectato liase, pectina liase e poligalacturonase de alguns desses fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de cultivo

Foi utilizado um isolado dos fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum fruticola*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium expansum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma virens* pertencentes à coleção do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa. O fungo *C. lindemuthianum* foi cultivado em meio YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) a 22 °C e os demais fungos foram cultivados em meio BDA (Himedia) a 25 °C por 7 dias.

Para determinação da atividade enzimática, aproximadamente 10⁵ conídios/mL de cada fungo foram inoculados em meio mínimo mineral tamponado pH 6,8 (K₂HPO₄ 6,98 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 5,44 g.L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,0 g.L⁻¹) suplementados com MgSO₄.7H₂O 1,1 g.L⁻¹, sacarose 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 0,6 g.L⁻¹ e pectina 1 g.L⁻¹ com agitação de 150 rpm por 5 dias a 25 °C.

O micélio foi filtrado e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade enzimática.

Identificação e caracterização de pectinases em *C. lindemuthianum*

Para a identificação dos genes que codificam pectinases, de suas regiões promotoras e das proteínas putativas foi utilizado o genoma disponível no banco de dados do NCBI - (Tabela suplementar 1) do isolado A₂ 2-3 de *C. lindemuthianum* pertencente a raça fisiológica 89 (DE QUEIROZ et al., 2017). A predição de genes em *C. lindemuthianum* foi realizada por meio do software Augustus (STANKE; MORGENSTERN, 2005).

As proteínas putativas de *C. lindemuthianum* foram utilizadas para a identificação de enzimas ativas em carboidratos utilizando o banco de dados CAZy (YIN et al., 2012) e o servidor dbCAN (LOMBARD et al., 2014). O valor de corte utilizado para o *e-value* foi 10⁻³. Somente as proteínas presentes nas famílias envolvidas na degradação de pectina foram selecionadas (Tabela suplementar 2). As redundâncias detectadas foram classificadas com base no menor *e-value*. Quando necessário, as sequências de proteínas foram checadas manualmente por meio de comparação com sequências de proteínas presentes nos bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Uniprot ou Pfam (EL-GEBALI et al., 2019).

A identificação de sítios de ligação a fatores transcricionais foi realizada por busca manual em 1.200 pares de bases antes do códon de iniciação de cada gene que codifica pectinase. Foi verificado a presença de TATA Box (TATAWAW) e a presença de possíveis sítios de ligação aos fatores transcricionais PacC (GCCARG), CreA (SYGGRG), GaaR (TCCNCCAA) e complexo HAP (CCAAT). Os íntrons presentes em cada gene foram identificados por meio do arquivo de saída do software Augustus (STANKE; MORGENSTERN, 2005). Os domínios proteicos presentes nas pectinases foram identificados por meio de busca no banco de dados Pfam. O peptídeo sinal presente nas pectinases foram identificados pela ferramenta online Signalp 4.1 (PETERSEN et al., 2011). Os sítios de N-glicosilação foram identificados nas pectinases por meio da ferramenta NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). O ponto isoelétrico e o peso

molecular de cada pectinase foram identificados por meio da ferramenta ExPasy Compute pI/Mw (GASTEIGER et al., 2005).

Perfil de expressão de genes de pectinases no transcriptoma de *C. lindemuthianum* em interação com o feijoeiro-comum

Foram utilizados dados do transcriptoma da interação de *C. lindemuthianum* com feijoeiro susceptível nos tempos de 0h, 24 h, 72 h e 96 h depositados no Arquivo de Leitura de Sequência (SRA) do NCBI com número de acesso PRJNA342420 resultantes do trabalho publicado por Padder et al. (2016).

As sequências de baixa qualidade foram removidas utilizando o software Trimmomatic v. 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). O genoma do fungo *C. lindemuthianum* foi indexado utilizando o software Bowtie2 v. 2.2.8 (LANGMEAD et al., 2009) nas configurações padrão e mapeado contra cada biblioteca do transcriptoma utilizando o software Tophat v. 2.1.1 (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). A quantificação da expressão de cada biblioteca foi realizada com o software Cufflinks v. 2.2.1 (TRAPNELL et al., 2010), agrupadas com a ferramenta Cuffmerge e comparados a expressão com a ferramenta Cuffdiff. Os valores de FPKM dos genes que codificam pectinases foram utilizados para a construção do heatmap utilizando o software Orange (DEMŠAR et al., 2013). A figura contendo o heatmap e a identificação das pectinases foi montada utilizando o software CorelDraw X7. A análise da expressão diferencial foi realizada para cada gene que codifica pectinase por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni ($p < 0,05$) utilizado o software Prism – graphpad 5.

Análise de agrupamento de sequências de pectinases e distribuição de pectinases em fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida

As sequências das proteínas preditas de 18 fungos do gênero *Colletotrichum* e de 48 fungos e oomicetos com estilos de vida diferentes presentes no banco de dados do NCBI (Tabela suplementar 1) foram utilizadas para a identificação de enzimas ativas em carboidratos utilizando os mesmos parâmetros e critérios adotados anteriormente para *C. lindemuthianum*. A

qualidade da montagem dos genomas utilizados foi avaliada por meio do BUSCO (SIMÃO et al., 2015) utilizando o conjunto de genes conservados.

As sequências de proteínas identificadas como pectinases em *C. lindemuthianum* foram utilizadas para comparação de similaridade com pectinases putativas de outros fungos do gênero *Colletotrichum* por meio do alinhamento par a par, utilizando o software de alinhamento múltiplo MUSCLE (EDGAR, 2004). O alinhamento foi utilizado para construção de uma matriz de distância para as sequências de aminoácidos utilizando o software Emboss (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000). O software estatístico R (R CORE TEAM, 2017) foi empregado na montagem de uma representação visual da matriz da distância obtida em escala multidimensional com duas dimensões.

Utilizando o número de pectinases identificado no proteoma predito de todos os micro-organismos foi construído um heatmap no software Orange (DEMŠAR et al., 2013). A relação entre os micro-organismos foi acessada utilizando a ferramenta taxonômica presente no NCBI utilizando o taxonomy ID de cada espécie (Tabela suplementar 1). A árvore filogenética extraída do NCBI foi editada utilizando a ferramenta online iTOL (LETUNIC; BORK, 2019). A figura contendo o heatmap e a relação filogenética entre os micro-organismos foi montada utilizando o software CorelDraw X7.

Determinação da atividade de pectinases

Os fungos *A. niger*, *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *C. fruticola*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *P. expansum*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *T. lentiforme* e *T. virens* foram utilizados para a dosagem de atividade enzimática de pectato liase, pectina liase e poligalacturonase por apresentarem diferentes estilos de vida.

A atividade de pectato liase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Collmer et al. (1988). Utilizando 0,5 ml do sobrenadante em 2,5 mL do substrato (Tris-HCl 60 mM pH 8,5; ácido poligalacturônico P7276 (Sigma) 0,25%; CaCl₂ 1 mM) e incubada por 30 min a 40 °C. Nos tempos 0 e 30 min uma alíquota de 0,5 ml da mistura foi removida e adicionada a 4,5 mL de HCl 0,01 M para interromper a reação. A absorbância das amostras foi medida por espectrofotometria a 235 nm de comprimento de onda. Uma unidade de pectato liase foi definida como quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol

de produto insaturado por minuto. O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados foi estabelecido 4.600 L/cm/mol (COLLMER; RIED; MOUNT, 1988).

A atividade de pectina liase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Albersheim & Killias (1962). Utilizando 1,5 ml do sobrenadante em 1,0 mL do substrato (pectina cítrica P-9135 (Sigma) 2,5%; tampão fosfato 50 mM, pH 6,8) e incubada por 30 min a 40 °C. Nos tempos 0 e 30 min uma alíquota de 0,5 ml da mistura foi removida e adicionada a 4,5 mL de HCl 0,01 M para interromper a reação. A absorbância das amostras foi medida por espectrofotometria a 235 nm de comprimento de onda. Uma unidade de pectina liase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol do produto insaturado por minuto de reação. O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados foi estabelecido 5550 M⁻¹.cm⁻¹ (ALBERSHEIM, 1966).

A atividade de poligalacturonase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Miller (1959) baseada na dosagem de açúcar redutor segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico). Utilizando 0,5 ml do sobrenadante em 1,5 mL do substrato (ácido poligalacturônico P-3889 (sigma) 1,3%; tampão acetato de sódio e NaCl 2,5 M, pH 4,8) e incubada por 20 min a 40 °C. Nos tempos 0 e 20 min uma alíquota de 0,125 mL da mistura foi removida e adicionada 0,5 mL de DNS para interromper a reação. Ácido galacturônico G-2125 (Sigma) foi utilizado para obtenção da curva padrão. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto de reação.

RESULTADOS

Pectinases em *C. lindemuthianum*

Na espécie *C. lindemuthianum* foram identificados 58 genes que codificam proteínas putativas que atuam na cadeia principal da pectina, divididas em seis tipos de acordo com a sua função (Tabela 1). Das pectinases putativas identificadas, 40% são pectato liases e 20% são poligalacturonases. Esses dois tipos de enzimas são as pectinases mais abundantes no proteoma predito do fungo *C. lindemuthianum*. Ambas as enzimas pectato liase e poligalacturonase estão envolvidas na degradação da cadeia principal, juntamente com a pectina liase e rhamnogalacturonase. As enzimas que atuam na remoção de grupos

metil ou acetil da cadeia principal da pectina correspondem a aproximadamente 19% das pectinases. O fungo *C. lindemuthianum* apresentou número de enzimas semelhante ao demais fungo do gênero *Colletotrichum*.

Foi analisada a região promotora dos 58 genes que codificam pectinases putativas (Figura 1a) em *C. lindemuthianum*. Em alguns promotores, mais de um do mesmo sítio putativo foi identificado. Na maioria das regiões promotoras analisadas, foram localizados sítios putativos de ligação para os fatores transcricionais CreA (49), complexo HAP (38) e PacC (36). Os sítios para CreA, PacC e PecR foram identificados nos promotores dos genes que codificaram para os 6 tipos de pectinases. Sequências de ligação para complexo HAP não foram identificados apenas nos promotores dos genes que codificaram para pectina metilesterases (PME). Sequências para TATA Box foram identificadas em 13 promotores analisados, não estando presente em promotores de genes que codificam para pectina liase. Sequências de ligação para o fator transcricional GaaR foram identificadas apenas em dois promotores de genes que codificam pectato liase, em dois promotores de genes que codificam poligalacturonase e em um promotor de gene que codifica para rhamnogalacturonase.

Na análise dos genes que codificam pectinases putativas foi observado variação no tamanho dos genes e número de introns (Figura 1b). Os genes putativos que codificam pectato liase apresentaram tamanho entre 497 e 2093 pares de bases (pb) e tamanho médio de sequência codificadora (CDS) próximo de 1100 pb. Esses genes apresentaram número de introns putativos variável, de nenhum até cinco introns. Os genes que codificam pectina liase apresentaram tamanho médio próximo de 1400 pares de bases (pb) e tamanho médio da CDS próximo de 1300 pb. A maioria desses genes apresenta nenhum ou apenas um intron. Os genes que codificam poligalacturonase apresentaram tamanho médio próximo de 1500 pb e tamanho da CDS próximo de 1300 pb. Os genes apresentaram número de introns variável, de nenhum até dez introns putativos, com a maioria apresentando um ou dois introns. Os genes que codificam rhamnogalacturonase apresentaram tamanho médio próximo de 2300 pb e tamanho médio da CDS próximo de 2000 pb. A maioria desses genes apresenta nenhum ou apenas um intron. Os genes que codificam somente metilesterases apresentaram tamanho médio próximo de 1100 pb e tamanho médio da CDS

próximo de 1050 pb. A maioria desses genes apresenta um intron. Os genes que codificam acetilesterases apresentaram tamanho médio próximo de 900 pb e tamanho médio da CDS próximo de 800 pb. A maioria desses genes apresenta um ou dois introns.

As pectinases putativas de *C. lindemuthianum* apresentam diferentes características (Figura 2a; Tabela suplementar 3). De todas as pectinases putativas, apenas em quatro não foi identificado o peptídeo sinal, sendo uma pectato liase, uma poligalacturonase e duas rhamnogalacturonase. A clivagem do peptídeo sinal ocorre entre os aminoácidos 15 e 37. Três pectinases putativas não apresentaram domínios pelo Pfam. Uma mesma proteína apresentou dois domínios de pectinases diferentes, um de pectato liase e um de pectinesterase (g11762). Algumas proteínas apresentaram outros domínios diferentes de pectinases, duas pectato liases e quase todas rhamnogalacturonase. Algumas pectinases apresentaram módulo de ligação a carboidrato, principalmente as rhamnogalacturonase. A maioria das rhamnogalacturonase não apresentou o domínio característico da família. As massas moleculares dessas proteínas estão entre 18 e 101 quilodaltons (KDa). As acetilesterases apresentam massa molecular próximo de 28 KDa. As pectato liases e metilesterases apresentam massa molecular próximo de 35 KDa. As poligalacturonases e pectina liases apresentam massa molecular próximo de 45 KDa. As rhamnogalacturonases, próximo de 74 KDa. O ponto isoelétrico (pI) variou entre 4 e 9. Aproximadamente 50% das pectato liase, pectina liase, metil e acetil esterases e 80% das poligalacturonases e rhamnogalacturonase apresentam pI menor ou igual a 7. Apenas dez pectinases putativas não apresentaram sítios de glicosilação, sendo oito delas pectato liase. O restante das pectinases apresentou de um a dez sítios. A maioria das poligalacturonases e rhamnogalacturonase possuem mais de três sítios de glicosilação, enquanto a maioria das pectato liases que possuem sítios de glicosilação e as pectina liases, possuem até três sítios.

Perfil de expressão de pectinases em *C. lindemuthianum*

Os genes que codificam pectinases identificados no genoma de *C. lindemuthianum* foram utilizados para mapeamento no transcriptoma da interação com o seu hospedeiro em quatro momentos (Figura 2b). Foi observado que 27 genes apresentam expressão diferencial em pelo menos um dos

momentos da interação avaliados. Existe a expressão diferencial de três genes que codificam pectinases no momento de 72 h de interação, que corresponde a fase biotrófica. Em 96 h após a infecção, 24 genes são considerados diferencialmente expressos. O período de 96 h após a infecção corresponde a fase necrotrófica. Houve a expressão diferencial de pelo menos um gene que codifica para um tipo de pectinase durante a interação do patógeno com o seu hospedeiro.

São detectados transcritos de 24 genes em algum dos momentos da interação, mas não são considerados diferencialmente expressos. Para 7 genes que codificam pectinases não foi detectado expressão em nenhum dos momentos avaliados. Apesar dos genes que codificam para pectato liase e poligalacturonase em *C. lindemuthianum* serem mais abundantes que os demais, nem todos são expressos. Nove e 4 dos genes que codificam pectato liases e poligalacturonases são diferencialmente expressos, respectivamente.

Similaridade de pectinases de *C. lindemuthianum* com pectinases de outros fungos do gênero *Colletotrichum*

As sequências de aminoácidos das pectinases de *C. lindemuthianum* foram analisadas quanto à similaridade entre elas e entre pectinases de outros fungos do gênero *Colletotrichum* (Figura 3). As pectinases analisadas apresentaram dissimilaridade entre si, permitindo a formação de grupos distintos entre as diferentes pectinases analisadas. As enzimas de *C. lindemuthianum*, destacadas em cores, estão presentes em quase todos os *clusters* de enzimas apresentados pelos demais fungos do gênero *Colletotrichum*. Foi possível observar a formação de pelo menos três agrupamentos entre as enzimas que apresentam a mesma atividade. Como exemplo, o número médio de pectato liases presentes em *Colletotrichum* spp. é 24, no entanto, essas 24 enzimas não são completamente similares (Figura 3a). Entre as pectato liases são formados três grupos com números diferentes de enzimas. A formação de grupos também pode ser observada para poligalacturonases (Figura 3b), rhamnogalacturonase (Figura 3c) pectina liases (Figura 3d), pectina metil esterases (Figura 3e) e pectina ou rhamnogalacturonana acetil esterases (Figura 3f).

Distribuição de pectinases em *Colletotrichum* spp. e em fungos com diferentes estilos de vida

Foram identificadas entre as proteínas preditas de 19 fungos do gênero *Colletotrichum* diferentes pectinases (Tabela 1). O número total de pectinases identificadas variou de 29 (*C. graminicola*) a 71 (*C. fruticola*). Dentro do complexo Orbiculare, o fungo *C. orbiculare* é o que apresenta maior número de pectinases e *C. lindemuthianum* o menor número. Os fungos desse gênero apresentaram seis tipos de enzimas envolvidas na degradação da pectina. O padrão de distribuição das pectinases é semelhante em todos os fungos do gênero. As enzimas que parecem ser mais abundantes nesses fungos são as pectato liases e as poligalacturonases. O número total de enzimas codificadas por todos os fungos é em média 60, com exceção dos fungos *C. graminicola* e *C. sublineola*, que apresentaram 50% do número de pectinases identificadas nas demais espécies de *Colletotrichum*.

Um *heatmap* foi construído utilizando as pectinases identificadas em *Colletotrichum* spp. e em outros fungos e oomicetos de diferentes táxons e estilos de vida (Figura 4, tabela suplementar 4). O número de pectinases presentes no genoma dos diferentes fungos utilizados parece estar mais relacionado com o estilo de vida apresentado do que com a relação taxonômica entre eles.

As pectinases são mais abundantes em fungos necrotróficos e hemibiotróficos independente do táxon (Figura 5; tabela suplementar 4). Os fitopatógenos de dicotiledôneas aparentam possuir maior número de pectinases do que os fitopatógenos de monocotiledôneas. Os fungos considerados biocontroladores possuem poucas pectinases. As exceções são os fungos *Arthrobotrys oligospora* e *Pythium oligandrum*, que mesmo assim apresentaram um número reduzido de pectinases. O mesmo foi observado para os fungos que são considerados biotróficos. Os demais fungos considerados apenas saprófitos ou oportunistas apresentaram número de pectinases semelhante aos dos fungos hemibiotróficos e necrotróficos utilizados nesta análise, com exceção das leveduras. Alguns dos fungos oportunistas utilizados são considerados patógenos pós-colheita.

Além dos fungos do gênero *Colletotrichum*, os fungos dos gêneros *Verticillium* (Ascomycota), *Rhizoctonia* (Basidiomycota) e o oomiceto

Phytophthora (Oomycota) que também possuem estilo de vida hemibiotrófico, apresentaram um maior número de pectinases em relação aos demais fungos utilizados. Foi observado uma abundância de pectato liases e poligalacturonases nesses gêneros. Em nenhum dos fungos fitopatogênicos o número de pectina liases é maior do que o de pectato liases ou poligalacturonases. Entre os fungos biotróficos não existe abundância de um tipo de pectinase.

Atividade enzimática de pectinases

Os fungos *A. niger*, *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *C. fruticola*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *P. expansum*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *T. lentiforme* e *T. virens* foram selecionados para a dosagem da atividade de pectinases por apresentarem diferentes estilos de vida (Figura 6). Somente para os fungos fitopatogênicos foi detectado a atividade enzimática de pectato liase. O fungo *F. oxysporum* apresentou atividade de pectato liase maior do que os fungos do gênero *Colletotrichum* nas condições testadas. No entanto, o número de genes que codificam pectato liase é maior nos fungos do gênero *Colletotrichum* (tabela suplementar 4). Não foram identificados genes que codificam pectato liase nos fungos do gênero *Trichoderma*, em *S. cerevisiae* e em *S. pombe*.

Todos os fungos fitopatogênicos apresentaram atividade de pectina liase. Houve variação na atividade enzimática entre os fungos fitopatogênicos do mesmo gênero. Os fungos *A. niger* e *P. expansum* também apresentaram atividade de pectina liase. Não foi detectado atividade e nem a presença de genes que codificam para pectina liase nos genomas dos demais fungos avaliados.

Com exceção das leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, os demais fungos apresentaram atividade enzimática de poligalacturonase. Os fungos que apresentaram maior atividade são do gênero *Fusarium*. Demais fungos fitopatogênicos, saprofíticos/oportunistas e biocontroladores apresentaram atividade enzimática semelhante. O número de genes que codificam poligalacturonases no genoma dos fungos fitopatogênicos são pelo menos o dobro dos demais fungos. Foi identificado apenas um gene que codifica poligalacturonase no genoma de *S. cerevisiae*.

DISCUSSÃO

O fungo fitopatogênico *C. lindemuthianum* possui 58 genes que codificam diferentes tipos de enzimas pectinolíticas. As pectinases putativas mais abundantes são as de despolimerização, as pectato liases, pectina liases, poligalacturonases e rhamnogalacturonases, que correspondem a 80% das pectinases. Os sintomas da doença observados nas plantas são decorrentes da ação de enzimas que atuam na maceração do tecido vegetal, como as pectinases, produzidas pelo fitopatógeno (VILLA-RIVERA et al., 2016). Algumas dessas enzimas presentes em *C. lindemuthianum* possuem o mesmo substrato, mas apresentam atividades diferentes. As plantas produzem diferentes moléculas capazes de inibir ou reduzir a atividade enzimática de determinadas pectinases e essas proteínas inibidoras são consideradas envolvidas na resistência do hospedeiro (BUGBEE, 1993; WATTAD; DINOOR; PRUSKY, 1994). Foi demonstrado que uma única proteína produzida por *P. vulgaris* foi capaz de inibir a atividade de poligalacturonase não só de *C. lindemuthianum*, como também de *A. niger* (FISHER; ANDERSON; ALBERSHEIM, 1973). Dessa forma, se o fungo *C. lindemuthianum* apresentasse um único tipo de pectinase a patogênese poderia estar comprometida devido a inibição ou redução da sua atividade, mas caso haja enzimas diferentes com atividade no mesmo substrato, o desenvolvimento da doença pode acontecer com maior garantia de sucesso.

Foram identificados sítios putativos de ligação principalmente para os fatores transcricionais CreA e PacC em 83% e 61% dos promotores analisados, respectivamente. Esses sítios foram identificados nos promotores dos genes que codificaram para os seis tipos de pectinases. A proteína CreA é um repressor catabólico responsável pela regulação de genes relacionados ao metabolismo de outras fontes de carbono quando em presença de glicose (CUBERO; SCAZZOCCHIO, 1994). Em *A. niger*, foi mostrado que o fator transcricional CreA está envolvido na regulação de genes que codificam pectinases (NIU et al., 2015). A presença desses sítios de ligação para CreA na maioria dos promotores de genes de pectinases analisados em *C. lindemuthianum* mostra que a repressão por CreA pode acontecer nesses genes, mas a ausência nas demais regiões promotoras mostra que a repressão por CreA não acontece em todas as pectinases. Em *C. gloeosporioides* foi relatado a expressão do gene *peIB*

(pectato liase B) em presença de glicose e ausência de sítios de ligação para CreA na região promotora desse gene (MIYARA et al. 2008). No entanto, em *Colletotrichum coccodes*, embora sítios de ligação para CreA tenham sido identificados na região promotora do gene *peIA* (pectato liase A), a enzima codificada por esse gene foi detectada na presença de glicose (BEN-DANIEL; BAR-ZVI; TSROR LAHKIM, 2012). Foi sugerido que essas sequências não estão envolvidas na repressão da glicose, sendo sítios não funcionais ou que a regulação por CreA pode ocorrer sob certas condições ambientais desconhecidas (BEN-DANIEL; BAR-ZVI; TSROR LAHKIM, 2012). Apesar de CreA regular enzimas responsáveis por degradar a parede celular vegetal (CWDE), durante a interação do fungo com o seu hospedeiro as CWDE são necessárias para causar os sintomas da doença. A inativação do gene *creA* em *Alternaria brassicicola* não afetou a capacidade da linhagem mutante de causar sintomas da doença em *Brassica oleracea* (CHO et al., 2009). Mesmo estando presentes na maioria dos promotores de genes de pectinases em *C. lindemuthianum*, esses genes não sofrem repressão por CreA durante a fase necrotrófica, já que os genes de pectinases são mais expressos nessa fase e os sintomas da doença são evidentes.

O PacC é um outro fator transcricional muito importante requerido para ativação de determinados genes em condições de pH alcalino e repressão de outros genes em condições de pH ácido (ESPESO et al., 1997). A presença de sítios de ligação para PacC na região promotora de genes considerados diferencialmente expressos em *C. lindemuthianum* na interação com o feijoeiro comum e de genes não considerados diferencialmente expressos sugere que PacC pode atuar aumentando ou reprimindo a expressão desses genes, dependendo das condições de pH do ambiente. Nas plantas, o pH do ambiente afeta a expressão de fatores de virulência, como as pectinases. Os tipos de pectinases produzidas por *C. lindemuthianum* atuam em substratos com pH diferentes, comumente as pectinas liases e poligalacturonases atuam em pH ácido ou próximo do neutro, enquanto que as pectato liases atuam em pH alcalino. Em *C. gloeosporioides* foi demonstrado que PacC regula principalmente genes que codificam CWDE, sugerindo que esses os genes regulados por PacC contribuem para a patogenicidade dos fungos no estágio necrotrófico (ALKAN et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que genes que codificam proteínas com

funções semelhantes, como pectinases, são regulados de forma diferente (ALKAN et al., 2013). Por exemplo, mutante $\Delta pac1$ (*pacC*) de *C. gloeosporioides* mostraram redução de 85% da expressão do transcrito pelB (pectato liase B) e os sintomas da doença em abacate (MIYARA et al., 2008). Em *C. lindemuthianum* foi observado que o gene *pacC* é transcrito em todos os momentos do processo de infecção, principalmente na fase necrotrófica, e que um mutante com o gene *pacC* inativado não foi capaz de causar maceração do tecido vegetal do seu hospedeiro, mesmo que a penetração tenha acontecido (SOARES et al., 2014). Essa ausência de sintomas pode ser decorrente da falta de indução de CWDE, como as pectinases. Em *F. oxysporum* mutantes para *pacC* foi observado aumento na transcrição de poligalacturonases em ambiente ácido, mas não em ambiente alcalino sugerindo outros mecanismos estão envolvidos na regulação de pectinases (CARACUEL et al., 2013). Adicionalmente, a ausência de sítios de ligação para PacC na região promotora de genes considerados diferencialmente expressos mostra que outros fatores transcricionais também estão envolvidos na sua regulação.

Sítios para PecR, GaaR e complexo HAP também foram identificados nos promotores analisados. As proteínas do complexo HAP são relacionadas com a regulação da expressão de genes em que seus produtos estão envolvidos na degradação da biomassa (BENOCCHI et al., 2017). Além dos reguladores mais gerais, os genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* podem ser induzidos por reguladores específico da pectina, como GaaR e pecR. A presença de sítios para PecR indica a possibilidade desses genes serem regulados por essa proteína (BENEN et al., 1996; COUTINHO et al., 2009). O fator transcricional GaaR está envolvido na ativação de genes relacionados a degradação de ácido poligalaturônico (ALAZI et al., 2016). A presença de sítios de ligação para diferentes fatores transcricionais conhecidos, indica que a regulação de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* pode ser complexa.

Foram encontrados introns na maioria dos genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* e estes introns apresentaram número variável mesmo em genes que codificam para enzimas com a mesma atividade. Os introns estão presentes nos genes que codificam para os seis tipos de pectinases analisados. Mais de 85% dos genes apresentaram introns pequenos, entre 50 e

100 nucleotídeos. Não houve uma correlação entre o número ou posição do introns presente no gene e a expressão desse gene. Os genes que foram mais expressos apresentaram número de introns variáveis. Não foi observado relação entre a similaridade dos genes de pectinases e o número ou posição do introns. Na análise de genes de quatro espécies do gênero *Fusarium*, foi observado que o número de introns variou de 0 a 15 introns por gene e a densidade média de introns por CDS foi de 2,53 (PHASHA et al., 2017). Além disso os exons corresponderam a 80% do tamanho dos genes analisados nas espécies do gênero *Fusarium* e nenhuma relação significativa foi encontrada entre o tamanho da CDS e o número de introns (PHASHA et al., 2017). Uma característica da presença de pelo menos um introns em um gene é a possibilidade da ocorrência de *splicing* alternativo (KEMPKEN, 2013). Com isso, esse tipo de mecanismo possibilitaria um aumento no arsenal pectinolítico de *C. lindemuthianum*. Tanto no ascomiceto *Fusarium graminearum*, quanto no basidiomiceto *Schizophyllum commun* foram identificados genes expressos com *splicing* alternativo, sendo o tipo mais comum a retenção de introns (GEHRMANN et al., 2016; ZHAO et al., 2013a).

De todas as pectinases putativas de *C. lindemuthianum*, apenas em quatro não foi identificado o peptídeo sinal. Como essas enzimas atuam no meio extra celular é interessante que sejam secretadas. A presença do peptídeo sinal indica a possibilidade de secreção dessas enzimas (PETERSEN et al., 2011). No entanto, algumas proteínas sem o peptídeo sinal também podem ser secretadas por mecanismos não convencionais em fungos (MIURA; UEDA, 2018). Apenas dez pectinases putativas de *C. lindemuthianum* não apresentaram sítios de N-glicosilação. O restante das pectinases apresentou de um a dez sítios. A N-glicosilação pode ser necessário para melhorar as características dessas pectinases. A N-glicosilação é um tipo de modificação pós-traducional que acontece com frequência em enzimas ativas em carboidratos, inclusive em pectinases (RUBIO et al., 2016). O efeito da N-glicosilação em poligalacturonase foi demonstrado em *Thielavia arenaria* (TU et al., 2014). A poligalacturonase N-glicosilada obteve maior estabilidade térmica, melhor afinidade pelo substrato, melhorando a sua atividade em comparação com a mesma poligalacturonase sem N-glicosilação. As pectinases de *C. lindemuthianum* apresentaram ponto isoelétrico (pI) variável. Apesar do pI não

estar relacionado com o pH ótimo de atividade e estabilidade enzimática, ele é importante na interação da enzima com o substrato (TALLEY; ALEXOV, 2010; XIA, 2007). Como na interação das pectinases com as diferentes moléculas que compõe a pectina.

Cerca de 45% dos genes que codificam pectinases putativas presentes no genoma de *C. lindemuthianum* apresentam expressão diferencial durante alguma fase de interação com o hospedeiro, sendo expressos principalmente na fase necrotrófica. Em *C. orbiculare* e *C. gloeosporioides* foi observado um maior número de genes que codificam pectinases em relação a outras enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, como celulases e hemicelulases (GAN et al., 2012). Além disso, o número de genes que codificam pectinases expressos em diferentes momentos da interação do fungo com o hospedeiro foi maior do que o número de genes que codificam para celulases e hemicelulases (GAN et al., 2012). Entre os 100 genes mais induzidos de *C. higginsianum* e *C. graminicola* tanto na comparação biotrófica vs. apressorial quanto necrotrófica vs. biotrófica encontram-se algumas pectinases (O'CONNELL et al., 2012). O nível de expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* e em outros fungos do gênero *Colletotrichum* em diferentes momentos da interação com seus hospedeiros apontam a importância do produto desses genes durante o processo de patogênese.

Como observado em *C. lindemuthianum*, muitos genes que codificam pectinase são expressos na fase necrotrófica. O efeito de maceração observado nas plantas, pode ser devido a ação conjunta de diversas pectinases, não somente de uma. O que pode ser observado quando se inativa um dos genes que codificam pectinases, e os sintomas da doença são reduzidos, mas não abolidos. Como em *C. lindemuthianum*, em que um gene que codifica pectato liase foi inativado e houve apenas redução no sintoma da doença em feijoeiro (CNOSSEN-FASSONI et al., 2013), ou em *F. oxysporum*, que a deleção de duas poligalacturonases em mutantes distintos não mostrou redução significativa na agressividade do patógeno e houve alteração da agressividade apenas quando os dois genes foram deletados no mesmo mutante (RUIZ; DI PIETRO; RONCERO, 2015).

Além de possuir enzimas pectinolíticas com diferentes atividades, pode-se observar que o fungo *C. lindemuthianum* apresenta mais de uma enzima com

a mesma atividade, com diferenças quanto a sua composição de aminoácidos. Essa diferença é essencial para a atividade enzimática em diferentes condições do substrato. As isoenzimas de um mesmo micro-organismos podem apresentar variação na sua atividade em condições de pH diferentes, concentrações de íons ou temperatura (DUBEY et al., 2016). A alteração de um ou alguns aminoácidos em uma enzima pode torna-la muito mais resistente a temperatura, a variações de pH ou até mesmo ocasionar aumento na atividade enzimática (WANG et al., 2018). Da mesma maneira, as condições do ambiente que as enzimas se encontram durante a infecção do hospedeiro pelo patógeno é variável, podendo ser modulada por ambos os organismos (LAGER et al., 2010; VYLKOVA, 2017). Como exemplo, o fungo *C. gloeosporioides* é capaz de alcalinizar as células do hospedeiro pela produção de amônia (MIYARA et al., 2010). A variação existente entre isoenzimas é importante também para escapar das proteínas inibidoras produzidas pelas plantas. A atividade enzimática pode ser reduzida em um substrato em decorrência da inibição parcial de algumas isoenzimas, mas não abolida. A atividade das poligalacturonases foi reduzida em diversos fungos por um inibidor desta enzima (PvPGIP2) produzido por plantas transgênicas de *Triticum aestivum*, entre eles *Fusarium moniliforme* e *Bipolaris sorokiniana*, mas este inibidor não foi capaz de inibir a atividade das poligalacturonases secretadas pelo fungo biotrófico *Claviceps purpurea*, não havendo alterações nos sintomas da doença (JANNI et al., 2008; VOLPI et al., 2013).

Assim como o fungo *C. lindemuthianum*, as demais espécies do gênero *Colletotrichum* mostraram-se ricas em enzimas pectinolíticas. Dentro do complexo Orbiculare, o fungo *C. orbiculare* é o que apresenta maior número de pectinases e *C. lindemuthianum* o menor número. O fitopatógeno *C. orbiculare* apresenta a maior gama de hospedeiro entre os fungos analisados do mesmo complexo, enquanto as demais espécies apresentam um ou dois hospedeiros (JAYAWARDENA et al., 2016). Os fungos *C. gloeosporioides*, *C. fioriniae* e *C. higginsianum* também apresentam ampla gama de hospedeiro, juntamente com *C. orbiculare* (JAYAWARDENA et al., 2016). No entanto, o fungo *C. fioriniae* apresenta o menor número de pectinase entre eles. Todos esses fungos são patógenos de dicotiledôneas. As espécies *C. graminicola*, *C. sublineola* e *C. orchidophilum* apresentaram baixo número de pectinases em relação aos demais fungos do gênero *Colletotrichum* analisados, sendo patógeno apenas de

monocotiledônea. O número de enzimas pectinolíticas parece não estar relacionado com a gama de hospedeiro apresentada pelo fungo, já que existem fitopatógenos que apresentam ampla gama de hospedeiro com menor número de pectinases e fungos com um único ou poucos hospedeiros com número maior de pectinases. O que pode ser observado é que os fungos que colonizam exclusivamente monocotiledôneas, apresentam menor número de pectinases em relação aos demais fungos do gênero. As dicotiledônias apresentam maior quantidade de pectina na composição da parede celular primária, entre 20% e 35 %, enquanto as monocotiledôneas podem apresentar cerca de 5% (VOGEL, 2008). Um menor número de enzimas pectinolíticas encontradas nos fungos que causam doença somente em monocotiledôneas pode estar relacionado com a adaptação do patógeno a quantidade de pectina presente nos tecidos dos hospedeiros desses fungos.

Foram analisadas as pectinases presentes em fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida. Foi observado que os fungos necrotróficos e hemibiotróficos, independente da relação taxonômica, apresentaram uma gama de enzimas pectinolíticas maior do que os fungos com outro estilo de vida. Esses tipos de enzimas são necessários não só para a colonização, mas para a aquisição de nutrientes, já que ao degradarem a parede celular vegetal as moléculas liberadas são utilizadas como fonte de nutrientes para esses micro-organismos (SCHMITZ et al., 2019). Todos os fungos biotróficos analisados, apresentaram genes que codificam para algum tipo de pectinase. A presença desses genes no genoma desses fungos biotróficos, mesmo que eles possuam uma relação de parasitismo mais íntima com a planta, pode ser importante para o estabelecimento da doença. Foi observada uma redução dos sintomas da doença causada pelo fungo *Claviceps purpurea* em plantas transgênicas de *Triticum durum* expressando um inibidor pectina metil esterase (VOLPI et al., 2013). Aparentemente, os genes que codificam as pectinases são mantidos no genoma dos micro-organismos que necessitam da sua utilização, não dependendo da sua relação taxonômica e sim do estilo de vida.

Foram selecionados para a dosagem da atividade de pectinases fungos que apresentam diferentes estilos de vida. A atividade enzimática detectada nos diferentes fungos foi variável. Os fungos fitopatogênicos apresentaram atividade enzimática para as três pectinases avaliadas quando crescidos em meio de

cultura com pectina. Embora os fungos do gênero *Colletotrichum* apresentem muito mais genes que codificam para pectinases do que fungos do gênero *Fusarium*, uma menor atividade de pectato liase foi observada em *Colletotrichum* spp. em comparação com *F. oxysporum*. A indução de todos os genes pode não ter acontecido durante o cultivo do fungo. A transcrição de genes que codificam pectinases é regulada por diversos fatores transcricionais e induzida por diferentes moléculas presentes no ambiente (SCHMITZ et al., 2019) ou até mesmo por isolados diferentes. Como foi observado em *C. lindemuthianum*, em que a indução do mesmo gene por dois isolados crescidos em meios de cultura com fontes de carbono distintas foi diferente temporalmente e quantitativamente (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Além dos fungos fitopatogênicos, os fungos considerados somente saprofíticos/opportunistas também apresentaram atividade de pectina liase. Os fungos escolhidos, *P. expansum* e *A. niger* são considerados patógenos pós colheita em diversas culturas, como em maçãs, por exemplo (LIU et al., 2017; VICO et al., 2014). Então para conseguir crescer e nutrir-se nesses substratos ricos em pectina é importante que esses fungos secretem essas enzimas. Com exceção da *S. cerevisiae* e *S. pombe*, todos os fungos apresentaram atividade de poligalacturonase, inclusive os fungos do gênero *Trichoderma*, considerados biocontroladores. Espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidas por colonizar diversos vegetais e atuar no biocontrole de diferentes fitopatógenos. Foi demonstrado que as poligalacturonases secretadas por *T. virens* estão envolvidas no processo de indução de resistência vegetal (SARROCCO et al., 2017).

Para os fungos fitopatogênicos como *C. lindemuthianum*, o arsenal pectinolítico é importante para que o processo de patogênese ocorra com sucesso. Os sintomas da doença observados no hospedeiro são decorrentes da atividade de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, entre elas as pectinases. Tendo em vista o número e a diversidade de enzimas pectinolíticas apresentados por *C. lindemuthianum*, os sintomas observados podem ser decorrentes de uma atividade conjunta das enzimas pectinolíticas, o que torna difícil determinar qual seria a mais importante durante a maceração do hospedeiro. Além da importância para a patogenicidade, a riqueza de enzimas pectinolíticas presente em *C. lindemuthianum*, pode representar um reservatório de enzima para aplicações na indústria, já que esses fungos apresentam vários

tipos de pectinases e essas pectinases variam entre si. Além disso, as pectinases estão presentes no genoma de diversos fungos e oomicetos variando em número e tipo, sejam eles fitopatogênicos ou não.

REFERÊNCIAS

- ALAZI, E. et al. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. **FEBS Letters**, v. 590, p. 1804–1815, 2016.
- ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 628–631, 1966.
- ALBERSHEIM, P.; KILLIAS, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, n. 1, p. 107–115, 1962.
- ALKAN, N. et al. Global aspects of PacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. **Molecular Plant-Microbe Interaction** v. 26, n. 11, p. 1345–1358, 2013.
- BEN-DANIEL, B. H.; BAR-ZVI, D.; TSROR LAHKIM, L. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 2, p. 187–197, 2012.
- BENEN, J. et al. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. **Progress in Biotechnology**, v. 14, p. 331–346, 1996.
- BENOCCI, T. et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–25, 2017.
- BENOIT, I. et al. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BUGBEE, W. M. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. **Phytopathology**, v. 83, n. 1, p. 63-68, 1993.
- CARACUEL, Z. et al. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–779, 2003.
- 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**, v. 10, n. 6, p. 769–775, 1997.

CHO, Y. et al. Identification of novel virulence factors associated with signal transduction pathways in *Alternaria brassicicola*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 1316–1333, 2009.

CNOSSEN-FASSONI, A. et al. The pectate lyase encoded by the *pecCh1* gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 461–470, 2013.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M. S. Assay Methods for Pectic Enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 329–335, 1988.

COUTINHO, P. M. et al. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal genetics and biology**, v. 46 Suppl 1, n. 1, p. S161–S169, 2009.

CUBERO, B.; SCAZZOCCHIO, C. sites CREA-mediated. **Embo Journal**, v. 13, n. 2, p. 407–415, 1994.

DE QUEIROZ, C. B. et al. Draft genome sequences of two isolates of *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in common beans. **Genome Announcements**, v. 5, n. 18, p. 17–18, 2017.

DEMŠAR, J. et al. Orange: data mining toolbox in python. **Journal of Machine Learning Research**, v. 14, p. 2349–2353, 2013.

DUBEY, A. et al. Molecular biology of microbial pectate lyase: a review. **British Biotechnology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2016.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 427–432, 2019.

ESPESO, E. A. et al. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, n. 4, p. 466–480, 1997.

FISHER, M. L.; ANDERSON, A. J.; ALBERSHEIM, P. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. **Plant Physiology**, v. 51 p. 489–491, 1973.

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

1236–1249, 2012.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

GASTEIGER, E. et al. The Proteomics Protocols Handbook. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–608, 2005.

GEHRMANN, T. et al. *Schizophyllum commune* has an extensive and functional alternative splicing repertoire. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 384–395, 2010.

JANNI, M. et al. The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 171–177, 2008.

JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192–1260, 2016.

KAMIJO, J. et al. Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Aspergillus luchuensis* var. *saitoi*. **Food Chemistry**, v. 276, p. 503–510, 2019.

KEMPKEN, F. Alternative splicing in ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4235–4241, 2013.

LAGER, I. et al. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. **Plant, Cell & Environment**, v. 123, n. 19, 2010.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, 2009.

LARA-MÁRQUEZ, A. et al. Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 260, 2011.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. 256–259, 2019.

LIU, C. Q. et al. Polygalacturonase gene *pgxB* in *Aspergillus Niger* is a virulence factor in apple fruit. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 43, 2017.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in

2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MIURA, N.; UEDA, M. Evaluation of unconventional protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Cells**, v. 7, n. 9, p. 128, 2018.
- MIYARA, I. et al. Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum Gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. **Molecular Plant Pathology**. v. 9, n. 3, p. 281–291, 2008.
- MIYARA, I. et al. PH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 3, p. 304–316, 2010.
- NIU, J. et al. The interaction of induction and repression mechanisms in the regulation of galacturonic acid-induced genes in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 32–42, 2015.
- 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, 12 set. 2012.
- O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75–98, 1985.
- PADDER, B. A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–26, 2016.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.
- PHASHA, M. M. et al. Architecture and distribution of introns in core genes of four *Fusarium* species. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 11, p. 3809–3820.
- PHUTELA, U. et al. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 63–69, 2005.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing [Internet], Vienna, Austria Available from: <https://www.r-project.org>
- RICE, P.; LONGDEN, L.; BLEASBY, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000.

RUBIO, M. V. et al. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of *Aspergillus nidulans* grown on lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

RUIZ, G. B.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Combined action of the major secreted exo- and endopolygalacturonases is required for full virulence of *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 339–353, 2015.

SARROCCO, S. et al. The constitutive endopolygalacturonase TvPG2 regulates the induction of plant systemic resistance by *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. 537–544, 2017.

SCHMITZ, K. et al. Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2507–2524, 2019.

SHARMA, P. N. et al. Yield loss assessment in common bean due to anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) under sub temperate conditions of North-Western Himalayas. **Indian Phytopathology**, v. 61, n. 3, p. 323–330, 2008.

SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 2015.

SOARES, M. A. et al. PacCl, 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, n. 4, p. 769–785, 2014.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: A web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 465–467, 2005.

TALLEY, K.; ALEXOV, E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 12, p. 2699–2706, 2010.

TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511–515, 2010.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.

TU, T. et al. Molecular characterization of a thermophilic endopolygalacturonase from *Thielavia arenaria* XZ7 with high catalytic efficiency and application potential in the food and feed industries. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, v. 62, n. 52, p. 12686–12694, 2014.

VICO, I. et al. Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 29, n. 4, p. 257–266, 2014.

VILLA-RIVERA, M. G. et al. The role of virulence factors in the pathogenicity of *Colletotrichum* sp. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 1005–1018, 2016.

VINCKEN, J. et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781–1789, 2003.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 301–307, 2008.

VOLPI, C. et al. *Claviceps purpurea* expressing polygalacturonases escaping PGIP inhibition fully infects PvPGIP2 wheat transgenic plants but its infection is delayed in wheat transgenic plants with increased level of pectin methyl esterification. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 294–301, 2013.

VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–6, 2017.

WANG, X. et al. Improving the specific activity and thermo-stability of alkaline pectate lyase from *Bacillus subtilis* 168 for bioscouring. **Biochemical Engineering Journal**, v. 129, p. 74–83, 2018.

WATTAD, C. et al. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, n. 3, p. 197–212, 1997.

WATTAD, C.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: A possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 2, p. 293–297, 1994.

XIA, X. Protein isoelectric point. In: XIA, X. **Bioinformatics and the Cell**, Springer, 2007. p. 207–219.

Protein isoelectric point. In: Bioinformatics and the Cell. Springer, B
YADAV, S. et al. Purification, characterization and retting of *Crotolaria juncea* fibres by an alkaline pectin lyase from *Fusarium oxysporum* MTCC 1755. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 1–9, 2017.

YARULLINA, L. G.; AKHATOVA, A. R.; KASIMOVA, R. I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant–pathogen interactions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, n. 2, p. 193–203, 2016.

YIN, Y. et al. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active

enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 445–451, 2012.

ZHAO, C. et al. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013a.

ZHAO, Z. et al. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 274, 2013b.

Tabela 1. Identificação das principais pectinases em *Colletotrichum* spp.

Complexo	Espécie	PEC	PNL	RGL	PME	AE	PG	Total
Acutatum	<i>C. fioriniae</i>	24	4	9	5	6	12	60
	<i>C. nymphaeae</i>	25	4	9	5	5	13	61
	<i>C. salicis</i>	24	4	9	8	5	13	63
	<i>C. simmondsii</i>	26	4	9	5	6	13	63
Destructivum	<i>C. higginsianum</i>	32	5	9	6	5	11	68
	<i>C. tanacetii</i>	29	5	9	5	4	10	62
Gloeosporioides	<i>C. fruticola</i>	25	8	10	5	7	16	71
	<i>C. gloeosporioides</i>	28	4	9	4	6	16	67
Graminicola	<i>C. graminicola</i>	10	2	4	3	4	6	29
	<i>C. sublineola</i>	10	2	4	3	4	8	31
Orbiculare	<i>C. lindemuthianum</i>	23	5	7	5	6	12	58
	<i>C. orbiculare</i>	28	7	10	5	6	13	69
	<i>C. sidae</i>	27	7	10	5	6	12	67
	<i>C. trifolii</i>	27	7	9	5	6	12	66
	<i>C. spinosum</i>	27	7	9	5	6	12	66
Spaethianum	<i>C. incanum</i>	28	5	8	7	5	12	65
	<i>C. tofieldiae</i>	28	5	8	8	6	12	67
Singleton	<i>C. chlorophyti</i>	26	8	9	6	5	13	67
	<i>C. orchidophilum</i>	21	4	8	5	5	9	52

PEC: Pectato liase; PNL: Pectina liase; RGL: Rhamnogalacturonases; PME: Pectina metilesterase; AE: Pectina ou rhamnogalacturonana acetilesterase; PG: Poligalacturonase.

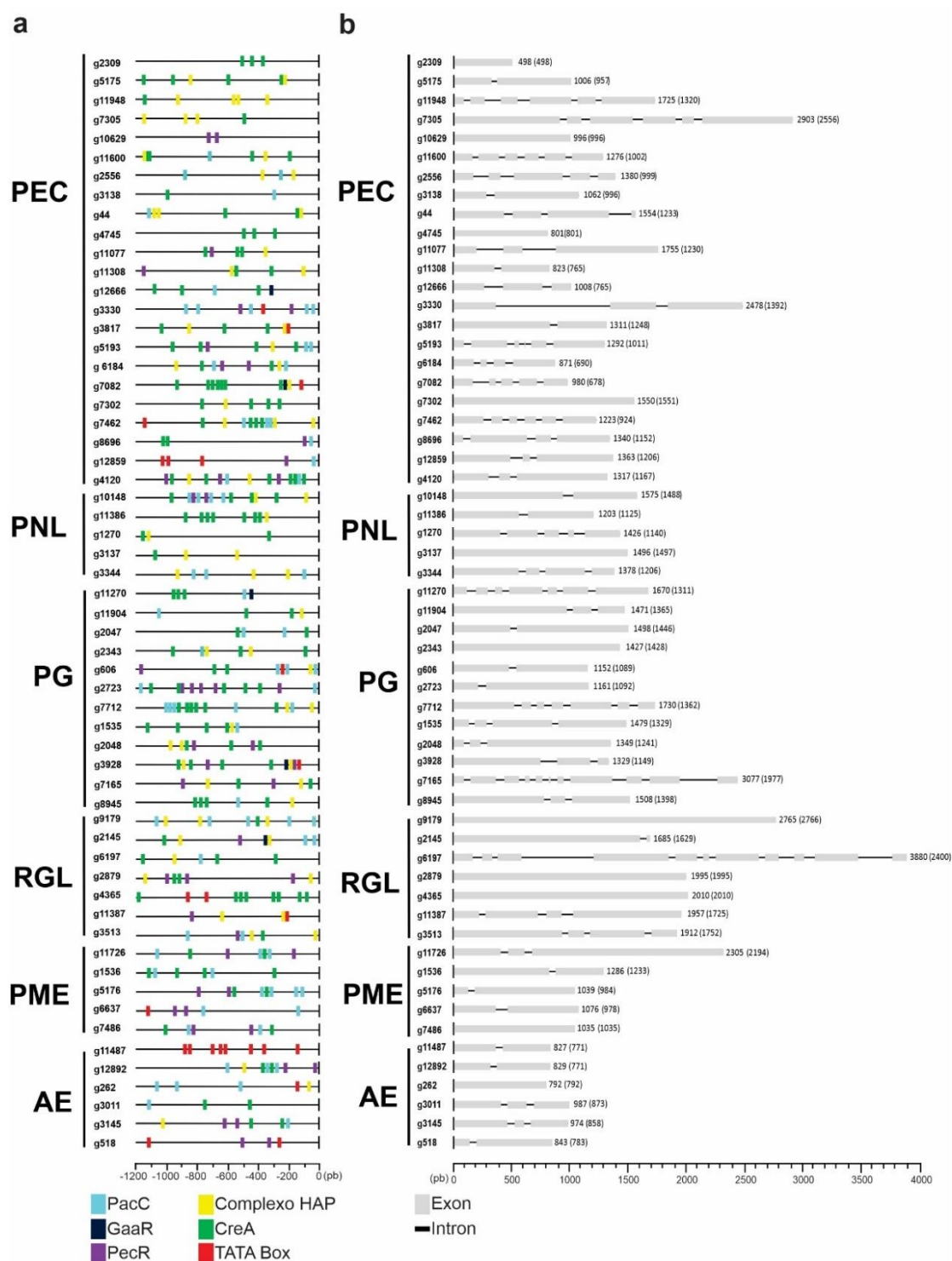


Figura 1. Caracterização de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum*. (a) Identificação de sítios de ligação para diferentes fatores transcricionais na região promotora. (b) Identificação dos introns. Ao final de cada gene está indicado o seu tamanho em pares de bases (pb) e entre parênteses o tamanho da região codificadora em pb. PEC: Pectato liase; PNL: Pectina liase; PME: Pectina metilesterase; PG: Poligalacturonase; AE: Pectina ou Rhamnogalacturonana acetilesterase; RGL: Rhamnogalacturonase; pb: pares de bases.

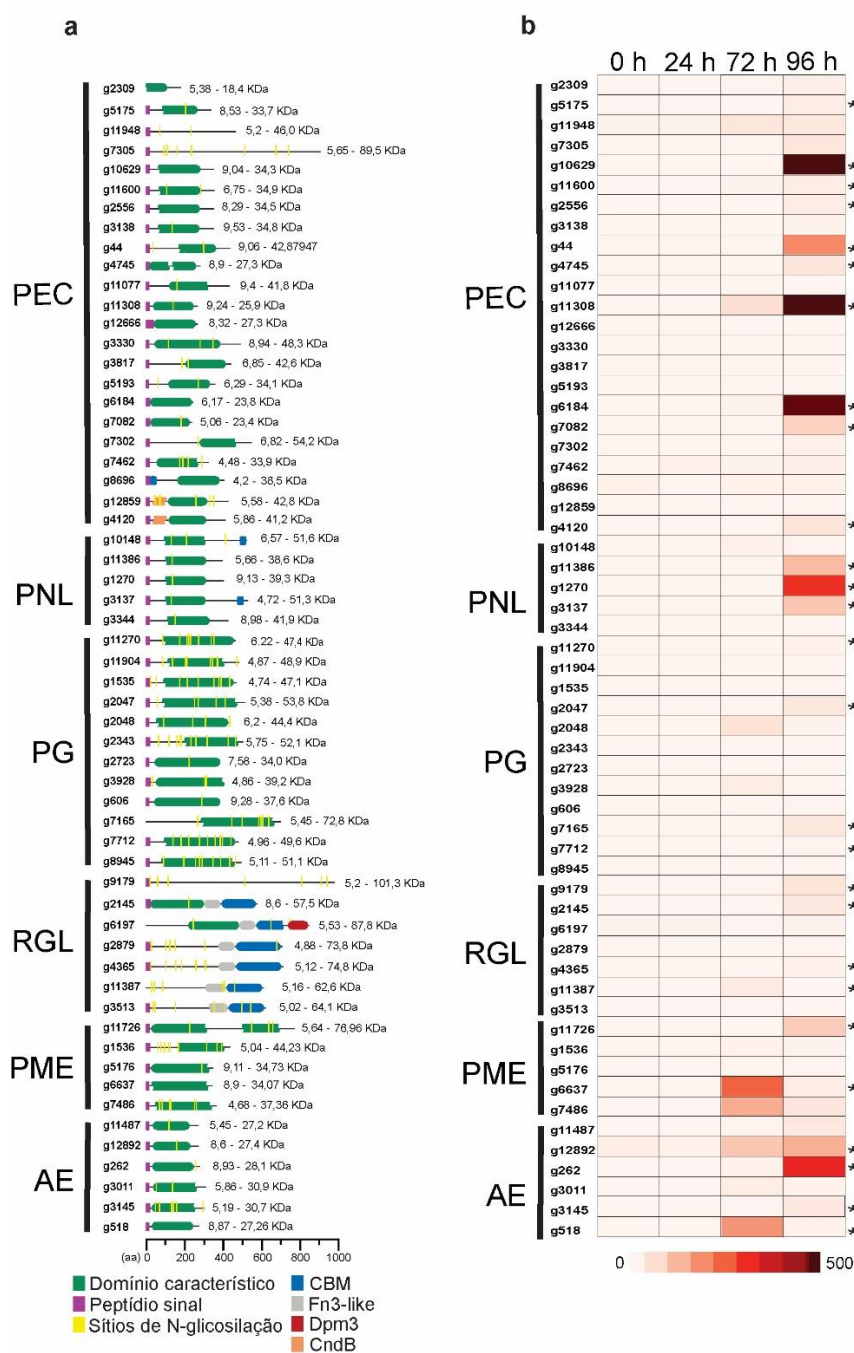


Figura 2. Caracterização das pectinases putativas e expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum*. (a) Identificação de peptídeo sinal, domínios, sítios de N-glicosilação, ponto isoelétrico (pI) e massa molecular para diferentes pectinases putativas. Ao final de cada proteína está o valor de pI seguido da massa molecular em quilodaltons (KDa). (b) Expressão em FPKM de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* durante a interação com feijoeiro-comum. Aa: aminoácidos; CBM: módulo de ligação a carboidrato; Fn3-like: Fibronectina-3-like; DPM3: Dolicol-fosfato Manosiltransferase subunidade 3; CndB: Condroitinase B; PEC: Pectato liase; PNL: Pectina liase; PME: Pectina metilesterase; PG: Poligalacturonase; AE: Pectina ou Rhamnogalacturonana acetilesterase; RGL: Rhamnogalacturonase; *: Genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$ pelo teste de Bonferroni).

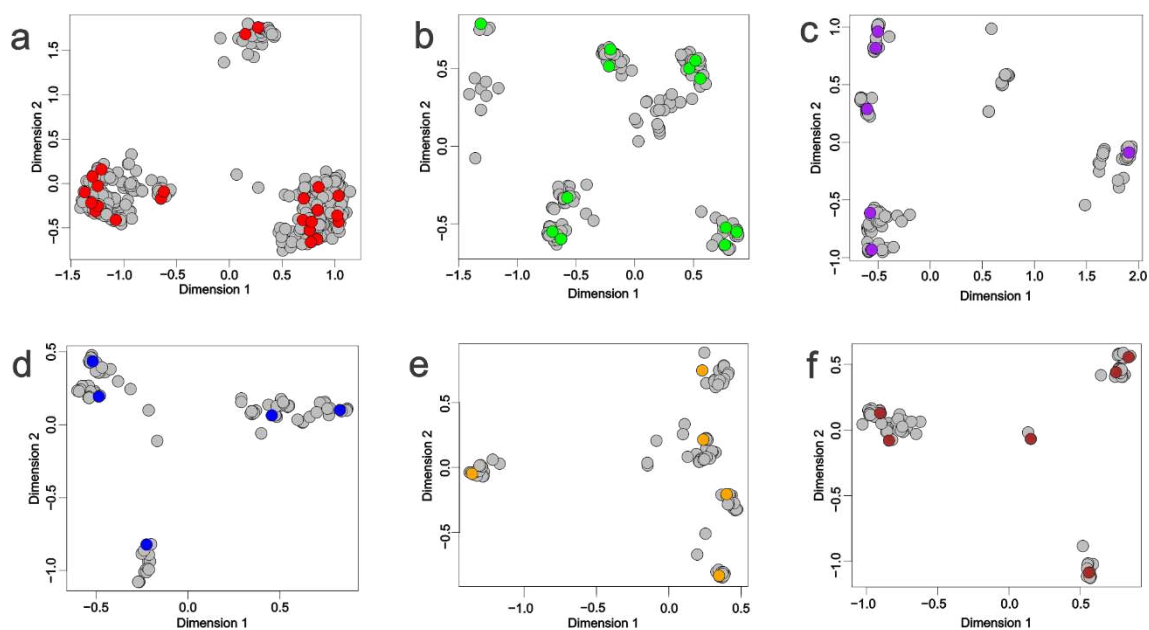


Figura 3. Similaridade das pectinases identificadas em *Colletotrichum* spp. a) pectato liase; b) poligalacturonase; c) rhamnogalacturonase d) pectina liase; e) pectina metilesterases; f) pectina ou rhamnogalacturonana acetilesterase. As pectinases do fungo *C. lindemuthianum* estão destacadas nas cores vermelha (a), verde (b), roxa (c), azul (d), laranja (e) e vinho (f).

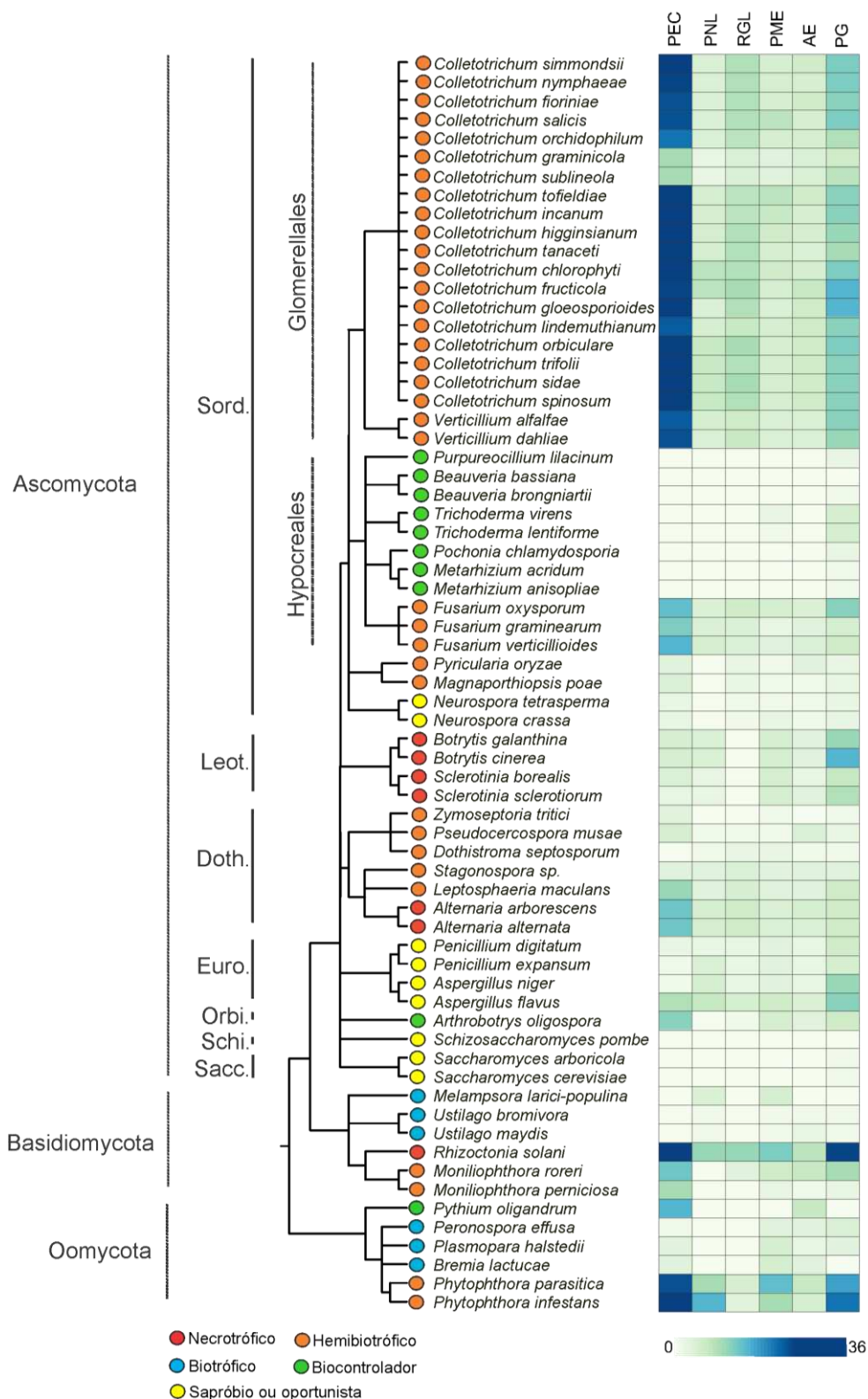


Figura 4. Distribuição de pectinases em fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida e relações taxonômicas. PEC: Pectato liase; PNL: Pectina liase; PME: Pectina metilesterase; PG: Poligalacturonase; AE: Pectina ou rhamnogalacturonana acetilesterase; RGL: Rhamnogalacturonana liase.

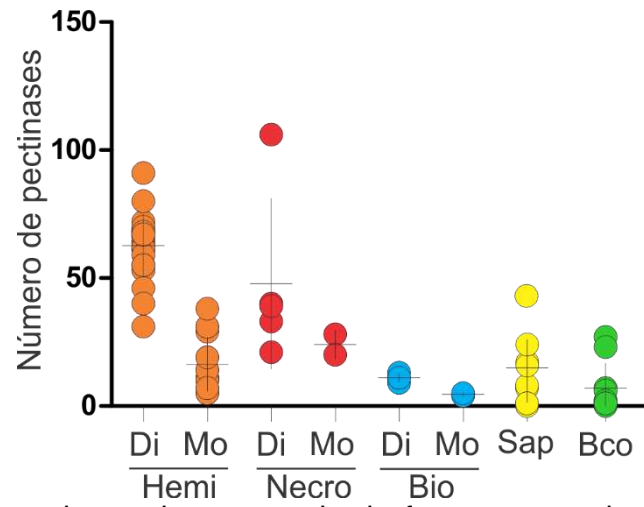


Figura 5. Número de pectinases totais de fungos e oomicetos com diferentes estilos de vida. Di: dicotiledônea; Mo: monocotiledônea; Hemi: hemibiotrófico; necro: necrotrófico; Bio: biotrófico; Sap: saprófito ou oportunista; Bco: biocontrolador.

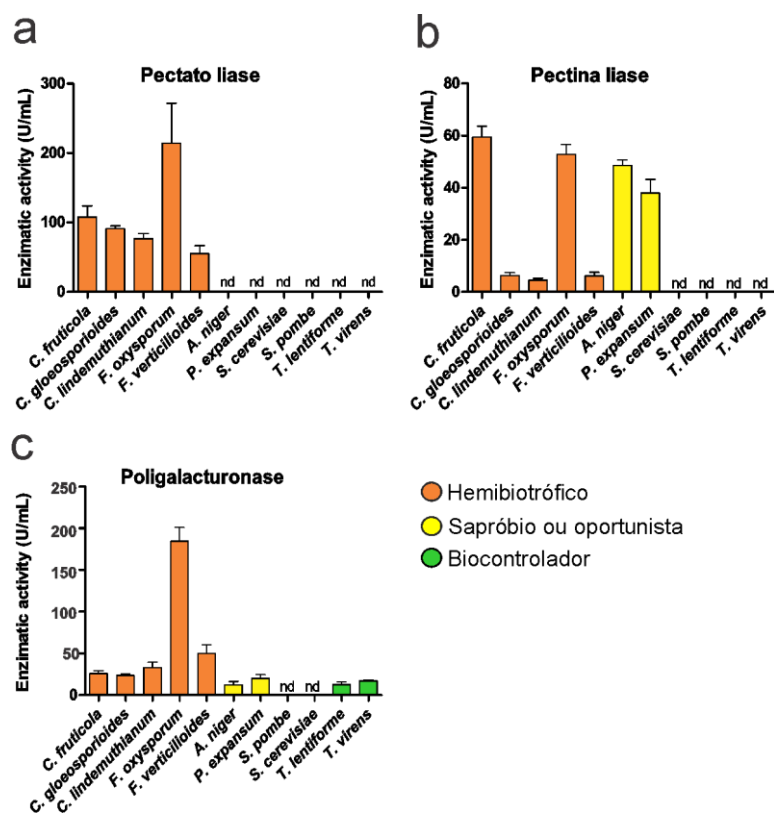


Figura 6. Atividade de pectinases de fungos com diferentes estilos de vida. a) pectato liase; b) pectina liase; c) poligalacturonase. nd: não detectada.

Tabela 1 Suplementar. Espécies de fungos usadas para a identificação de genes que codificam pectinases

Species	Taxonomy ID	Genome Access number (NCBI)	Assembly
<i>Alternaria alternata</i>	5599	LXPP00000000.1	GCA_001642055.1
<i>Alternaria arborescens</i>	156630	PDUP00000000.1	GCA_004154835.1
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	13349	ADOT00000000.1	GCA_000225545.1
<i>Aspergillus flavus</i>	5059	AAIH00000000.2	GCA_000006275.2
<i>Aspergillus niger</i>	5061	OGUI00000000.1	GCA_000002855.2
<i>Beauveria bassiana</i>	176275	ADAH00000000.1	GCA_001682635.1
<i>Beauveria brongniartii</i>	118266	AZHA00000000.1	GCA_001636735.1
<i>Botrytis cinerea</i>	40559	PRJNA15632*	GCA_000143535.4
<i>Botrytis galanthina</i>	278940	PQXL00000000.1	GCA_004916875.1
<i>Bremia lactucae</i>	4779	SHOA00000000.1	GCA_004359215.1
<i>Colletotrichum chlorophyti</i>	708187	MPGH00000000.1	GCA_001937105.1
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	710243	PNFH00000000.1	GCA_002930455.1
<i>Colletotrichum fruticola</i>	690256	SSNE00000000.1	GCA_009771025.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	474922	QFRH00000000.1	GCA_003243855.1
<i>Colletotrichum graminicola</i>	31870	ACOD00000000.1	GCA_000149035.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	80884	LTAN00000000.1	GCA_001672515.1
<i>Colletotrichum incanum</i>	1573173	JTLR00000000.1	GCA_001855235.1
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	290576	MASP00000000.2	GCA_001693025.2
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	306554	JEMN00000000.1	GCA_001563115.1
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	5465	AMCV00000000.2	GCA_000350065.2
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	1209926	MJBS00000000.1	GCA_001831195.1
<i>Colletotrichum salicis</i>	1209931	JFFI00000000.1	GCA_001563125.1
<i>Colletotrichum sidae</i>	1347389	QAPF00000000.1	GCA_004367935.1
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	703756	JFBX00000000.1	GCA_001563135.1
<i>Colletotrichum spinosum</i>	1347390	QAPG00000000.1	GCA_004366825.1
<i>Colletotrichum sublineola</i>	1173701	MQVQ00000000.1	GCA_001951195.1
<i>Colletotrichum tanacetii</i>	1306861	PJEX00000000.1	GCA_005350895.1

<i>Colletotrichum tofieldiae</i>	708197	LFHR00000000.1	GCA_001618715.1
<i>Colletotrichum trifolii</i>	5466	RYZW00000000.1	GCA_004367215.1
<i>Dothistroma septosporum</i>	64363	AIEN00000000.1	GCA_000340195.1
<i>Fusarium graminearum</i>	5518	AACM00000000.2	GCA_000240135.3
<i>Fusarium oxysporum</i>	5507	AAXH00000000.1	GCA_000149955.2
<i>Fusarium verticillioides</i>	117187	AAIM00000000.2	GCA_000149555.1
<i>Gaeumannomyces tritici</i>	36779		GCA_000145635.1
<i>Leptosphaeria maculans</i>	5022	UNSE00000000.1	GCA_000230375.1
<i>Melampsora larici-populina</i>	203908	AECX00000000.1	GCA_000204055.1
<i>Metarhizium acridum</i>	92637	ADNI00000000.1	GCA_000187405.1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	5530	AZNF00000000.1	GCA_013305495.1
<i>Moniliophthora roreri</i>	221103	LATX00000000.1	GCA_001466705.1
<i>Neurospora crassa</i>	5141	AABX00000000.3	GCA_000182925.2
<i>Neurospora tetrasperma</i>	40127	AFBT00000000.1	GCA_000213175.1
<i>Penicillium digitatum</i>	36651	AKCU00000000.1	GCA_000315645.2
<i>Penicillium expansum</i>	27334	JQFZ00000000.1	GCA_000769745.1
<i>Peronospora effusa</i>	542832	QKXF00000000.1	GCA_003843895.1
<i>Phytophthora infestans</i>	4787	AATU00000000.1	GCA_000142945.1
<i>Phytophthora parasitica INRA-310</i>	761204	AGFV00000000.2	GCA_000247585.2
<i>Plasmopara halstedii</i>	4781	CCYD00000000.1	GCA_900000015.1
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	280754	LSBJ00000000.2	GCA_001653235.2
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	1873960		GCA_000340215.1
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	33203	LSBI00000000.1	GCA_001653265.1
<i>Pyricularia oryzae</i>	318829	AACU00000000.3	GCA_000002495.2
<i>Pythium oligandrum</i>	41045	SPLM00000000.1	GCA_005966545.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	456999	JATN00000000.1	GCA_000524645.1
<i>Saccharomyces arboricola</i>	706196	ALIE00000000.1	GCA_000292725.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4932	PRJNA128*	GCA_000146045.2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4896	GCA_000002945.2	GCA_000002945.2
<i>Sclerotinia borealis</i>	77105	AYSA00000000.1	GCA_000503235.1

<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5180	AAGT00000000.1	GCA_000146945.2
<i>Stagonospora sp.</i>	1904476	LXTA00000000.1	GCA_001644525.1
<i>Trichoderma lentiforme</i>	1567552	QLNT00000000.1	GCA_011066345.1
<i>Trichoderma virens</i>	29875	ABDF00000000.2	GCA_000170995.2
<i>Ustilago bromivora</i>	307758	GCA_900080155.1	GCA_900080155.1
<i>Ustilago maydis</i>	5270	AACP00000000.2	GCA_000328475.2
<i>Verticillium dahliae</i>	27337	ABJE00000000.1	GCA_000150675.2
<i>Verticillium nonalfafae</i>	1051616		GCA_003724135.2
<i>Zymoseptoria tritici</i>	1047171	ACPE00000000.1	GCA_000219625.1

Tabela Suplementar 2. Atividade enzimática de cada família Cazy

Família Cazy	Atividade ¹
CE8	Pectina metilesterase (EC 3.1.1.11).
CE12	Pectina acetilesterase (EC 3.1.1.-); Rhamnogalacturonana acetilesterase (EC 3.1.1.-).
CE13	Pectina acetilesterase (EC 3.1.1.-).
GH28	Poligalacturonase (EC 3.2.1.15); exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67); exo-poligalacturonosidase (EC 3.2.1.82); rhamnogalacturonase (EC 3.2.1.171); endo-xilogalacturonana hidrolase (EC 3.2.1.-); Rhamnogalacturonana a-L-rhamnopirano-hidrolase (EC 3.2.1.40).
PL1	Pectato liase (EC 4.2.2.2); exo-pectate liase (EC 4.2.2.9); Pectina liase (EC 4.2.2.10).
PL2	Pectato liase (EC 4.2.2.2); exo-poligalacturonato liase (EC 4.2.2.9).
PL3	Pectato liase (EC 4.2.2.2).
PL4	Rhamnogalacturonana endoliase (EC 4.2.2.23).
PL9	Pectato liase (EC 4.2.2.2); Exopoligalacturonato liase (EC 4.2.2.9); Thiopeptidoglican liase (EC 4.2.2.-); Rhamnogalacturonana endoliase (EC 4.2.2.23)
PL10	Pectato liase (EC 4.2.2.2).
PL11	Rhamnogalacturonana liase (EC 4.2.2.-); exo-insaturado Rhamnogalacturonana liase (EC 4.2.2.-).
PL26	Rhamnogalacturonana exoliase (EC 4.2.2.24).

¹Informações do banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>).

Tabela suplementar 3. Caracterização dos domínios proteicos das pectinases putativas

Família Cazy	Proteína ID	Tamanho (aa)	Família Pfam	descrição Pfam
CE12	g11487	256	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE12	g12892	256	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE12	g262	263	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE12	g3011	290	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE12	g3145	285	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE12	g518	260	Lipase_GDSL_2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family
CE8	g11726	727	Pectinesterase, Pec_lyase_C	Pectinesterase, Pectate lyase
CE8	g1536	410	Pectinesterase	Pectinesterase
CE8	g5176	327	Pectinesterase	Pectinesterase
CE8	g6637	325	Pectinesterase	Pectinesterase
CE8	g7486	344	Pectinesterase	Pectinesterase
GH28	g11270	436	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g11904	454	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g1535	442	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g2047	481	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g2048	413	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g2343	475	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g2723	363	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g3928	382	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g606	362	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g7165	658	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g7712	453	Glyco_hydro_28	Glycosyl hydrolases family 28
GH28	g8945	465	Glyco_hydro_29	Glycosyl hydrolases family 29
PL1	g2309	165	Pec_lyase_C	Pectate lyase

PL1	g5175	318	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_2	g11948	439	-	-
PL1_2	g7305	851	Beta_helix	Right handed beta helix region
PL1_4	g10148	495	Pec_lyase_C, CBM_1	Pectate lyase, Fungal cellulose binding domain
PL1_4	g11386	374	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_4	g1270	379	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_4	g3137	498	Pec_lyase_C, CBM_1	Pectate lyase, Fungal cellulose binding domain
PL1_4	g3344	401	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_7	g10629	331	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_7	g11600	333	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_7	g2556	332	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_7	g3138	331	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL1_7	g44	410	Pec_lyase_C	Pectate lyase
PL26	g9179	921	-	-
PL3	g4745	266	Pec_lyase_C, Pec_lyase_C	Pectate lyase, Pectate lyase
PL3_2	g11077	409	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g11308	254	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g12666	254	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g3330	463	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g3817	415	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g5193	336	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g6184	229	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g7082	225	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g7302	516	Pectate_lyase	Pectate lyase
PL3_2	g7462	307	Pectate_lyase	Pectate lyase

PL3_2	g8696	383	Pectate_lyase, CBM_1	Pectate lyase, Fungal cellulose binding domain
PL4_1	g2145	542	RhgB_N, CBM-like, fn3_3	Rhamnogalacturonan lyase B, N-terminal; Polysaccharide lyase family 4, domain III ; Polysaccharide lyase family 4, domain II
PL4_1	g6197	799	RhgB_N, DPM3, fn3_3, CBM-like	Rhamnogalacturonan lyase B, N-terminal; Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3 (DPM3); Polysaccharide lyase family 4, domain II; Polysaccharide lyase family 4, domain III
PL4_3	g2879	664	fn3_3, CBM-like	Polysaccharide lyase family 4, domain II; Polysaccharide lyase family 4, domain III
PL4_3	g4365	669	fn3_3, CBM-like	Polysaccharide lyase family 4, domain II; Polysaccharide lyase family 4, domain III
PL4_5	g11387	574	CBM-like, fn3_3	Polysaccharide lyase family 4, domain III; Polysaccharide lyase family 4, domain II
PL4_5	g3513	583	CBM-like, fn3_3	Polysaccharide lyase family 4, domain III; Polysaccharide lyase family 4, domain II
PL9_3	g12859	401	Beta_helix, Chondroitinas_B	Right handed beta helix region, Chondroitinase B
PL9_3	g4120	388	Beta_helix, Chondroitinas_B	Right handed beta helix region, Chondroitinase B

Tabela suplementar 4. Distribuição das pectinases em fungos com diferentes estilos de vida

Espécies	PEC	PNL	RGL	PME	AE	PG	Total
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	26	4	9	5	6	13	63
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	25	4	9	5	5	13	61
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	24	4	9	5	6	12	60
<i>Colletotrichum salicis</i>	24	4	9	8	5	13	63
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	21	4	8	5	5	9	52
<i>Colletotrichum graminicola</i>	10	2	4	3	4	6	29
<i>Colletotrichum sublineola</i>	10	2	4	3	4	8	31
<i>Colletotrichum tofieldiae</i>	28	5	8	8	6	12	67
<i>Colletotrichum incanum</i>	28	5	8	7	5	12	65
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	32	5	9	6	5	11	68
<i>Colletotrichum tanacetii</i>	29	5	9	5	4	10	62
<i>Colletotrichum chlorophyti</i>	26	8	9	6	5	13	67
<i>Colletotrichum fruticola</i>	25	8	10	5	7	16	71
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	28	4	9	4	6	16	67
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	23	5	7	5	6	12	58
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	28	7	10	5	6	13	69
<i>Colletotrichum trifolii</i>	27	7	9	5	6	12	66
<i>Colletotrichum sidae</i>	27	7	10	5	6	12	67
<i>Colletotrichum spinosum</i>	27	7	9	5	6	12	66
<i>Verticillium alfalfae</i>	24	5	6	4	4	12	55
<i>Verticillium dahliae</i>	25	4	7	4	4	11	55
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beauveria brongniartii</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Trichoderma virens</i>	0	0	0	2	0	5	7
<i>Trichoderma lentiforme</i>	0	0	0	1	0	5	6
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Metarhizium acridum</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	15	4	6	5	4	12	46
<i>Fusarium graminearum</i>	13	4	4	2	3	5	31
<i>Fusarium verticillioides</i>	16	5	4	3	4	6	38
<i>Pyricularia oryzae</i>	3	0	2	1	3	2	11
<i>Magnaportheopsis poae</i>	4	0	2	1	1	2	10
<i>Neurospora tetrasperma</i>	2	0	1	1	1	2	7
<i>Neurospora crassa</i>	2	0	1	2	1	2	8
<i>Botrytis galanthina</i>	5	4	0	5	3	11	28
<i>Botrytis cinerea</i>	5	4	0	5	3	16	33
<i>Sclerotinia borealis</i>	4	2	0	5	2	7	20
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2	2	0	5	3	9	21

<i>Zymoseptoria tritici</i>	3	0	0	1	0	1	5
<i>Pseudocercospora musae</i>	5	1	1	1	4	2	14
<i>Dothistroma septosporum</i>	0	1	2	2	1	1	7
<i>Stagonospora sp.</i>	3	3	4	3	3	3	19
<i>Leptosphaeria maculans</i>	11	3	5	3	3	6	31
<i>Alternaria arborescens</i>	14	5	6	4	5	6	40
<i>Alternaria alternata</i>	14	5	6	4	4	6	39
<i>Penicillium digitatum</i>	2	2	2	3	2	6	17
<i>Penicillium expansum</i>	1	4	2	3	2	5	17
<i>Aspergillus niger</i>	1	5	2	3	2	11	24
<i>Aspergillus flavus</i>	9	7	5	6	4	12	43
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	12	0	1	5	3	6	27
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces arboricola</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Melampsora larici-populina</i>	0	4	0	5	0	0	9
<i>Ustilago bromivora</i>	0	1	0	1	1	1	4
<i>Ustilago maydis</i>	0	1	0	1	2	1	5
<i>Rhizoctonia solani</i>	37	11	11	13	8	26	106
<i>Moniliophthora roreri</i>	14	0	3	6	7	10	40
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	10	0	0	2	1	2	15
<i>Pythium oligandrum</i>	16	0	0	0	7	0	23
<i>Peronospora effusa</i>	1	0	0	3	3	4	11
<i>Plasmopara halstedii</i>	3	0	0	5	2	3	13
<i>Bremia lactucae</i>	3	0	0	5	3	0	11
<i>Phytophthora parasitica</i>	25	10	5	15	7	18	80
<i>Phytophthora infestans</i>	35	16	3	10	5	22	91

PEC: Pectate lyase; PNL: Pectin lyase; PME: Pectin methylesterase; PG: Poligalacturonase; AE: Pectin ou rhamnogalacturonana acetylesterase; RGL: Rhamnogalacturonana lyase.

Capítulo 3

Deleção de gene em *Colletotrichum lindemuthianum* por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Deleção de gene em *Colletotrichum lindemuthianum* por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Leandro L. da Silva^a; Rafael de Oliveira Rosa^a; Ediones Amaro Garcia^a; Janaina Aparecida Teixeira^a; Tiago Antônio de Oliveira Mendes^b; Marisa V. de Queiroz^{a*}.

^aDepartamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

*E-mail: mvqueiro@ufv.br; Tel.: +55-31-3612-2451.

RESUMO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* possui genes que codificam diferentes enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, dentre elas as pectinases. As pectinases foram identificadas como importantes para a patogenicidade de diferentes fungos. Uma das estratégias usadas para avaliar a importância de uma determinada proteína para a patogenicidade é o isolamento de mutantes e para isto se faz necessário o desenvolvimento de um protocolo eficiente de mutagenese sítio direcionada. Para esse tipo de estudo, diferentes métodos de transformação são utilizados, como a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Os principais objetivos desse trabalho foram analisar a expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* durante a interação com feijoeiro-comum por meio de qPCR e a partir dos resultados obtidos, analisar funcionalmente genes candidatos por mutação sítio dirigida utilizando o sistema de transformação mediada por *A. tumefaciens*. Foram analisados 12 genes que codificam para diferentes pectinases em *C. lindemuthianum*. Onze genes apresentaram expressão em todos os momentos de interação do fitopatógeno com seu hospedeiro. Dos genes analisados, 9 apresentaram expressão diferencial somente na fase necrotrófica. Dois genes apresentaram expressão diferencial somente na fase biotrófica. A partir dos resultados obtidos, quatro genes que apresentaram

expressão diferencial foram selecionados para o isolamento de mutantes. Foram obtidos de 35 a 56 transformantes para cada gene alvo de deleção em condições iguais de transformação por ATMT. Todos os transformantes analisados por *Southern blot* apresentaram uma única cópia do cassete de deleção no genoma. De 180 transformantes analisados, foram obtidos dois mutantes para o gene *pecC16*. Os mutantes $\Delta pecC16$ obtidos não apresentaram diferença de morfologia, crescimento, esporulação e na patogenicidade em comparação com o selvagem. A expressão dos genes que codificam pectinases indica a importância dessas enzimas durante a interação de *C. lindemuthianum* com feijoeiro-comum. As vantagens da utilização de ATMT em *C. lindemuthianum* é ser um método simples, de fácil execução e a presença de uma única cópia do cassete no genoma dos transformantes. Uma desvantagem é o baixo número de mutantes em relação ao número de transformantes obtidos. O sistema ATMT não foi eficiente para deleção de genes em *C. lindemuthianum*. O gene *pecC16* não é essencial para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*.

Palavras-chave: pectinases; expressão gênica; antracnose; fitopatogenicidade.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma planta de origem nas américas, sendo utilizado principalmente seus grãos como fonte de proteína na alimentação humana em diversos países ao redor do mundo (MYERS; KMIECIK, 2017). A produtividade dessa cultura pode ser reduzida pela presença da doença antracnose nos campos de cultivo, quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (KUMAR et al., 1999). Essa doença é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, conhecido por apresentar diversas raças fisiológicas, tornando o seu controle uma tarefa difícil (DOS SANTOS et al., 2012).

Assim como a maioria dos fungos do gênero *Colletotrichum*, o fungo *C. lindemuthianum* apresenta uma estratégia de infecção hemibiotrófica. Durante a fase inicial, o patógeno penetra no tecido do hospedeiro e desenvolve estruturas primárias de colonização sem causar danos ao hospedeiro, conhecida como fase biotrófica (PERFECT et al., 1999). Depois de um determinado período, as

hifas do patógeno são modificadas e então a colonização das demais células do hospedeiro acontece, sendo precedida pela maceração dos tecidos pela ação enzimática e morte celular, conhecida como fase necrotrófica (DA SILVA et al., 2020). É nesse período que são observados os sintomas típicos da antracnose, que no feijoeiro é o escurecimento e necrose das nervuras nas folhas, e lesões deprimidas e escurecidas nos frutos e no caule (MUIMBA-KANKOLONGO, 2018). Os sintomas da doença observados nas plantas são decorrentes da ação de enzimas que atuam na maceração do tecido vegetal, como as pectinases, produzidas pelo fitopatógeno (VILLA-RIVERA et al., 2016). Como um dos principais componentes da parede celular vegetal é a pectina, é importante que os fungos possuam um arsenal de enzimas envolvidas na sua degradação (GLASS et al., 2013). Pelo envolvimento das pectinases durante o processo de patogênese, essas enzimas são consideradas como fatores de virulência dos fitopatógenos (SCHMITZ et al., 2019).

Em muitos fungos fitopatogênicos tem-se estudado o papel dessas enzimas na patogenicidade, visto que elas são importantes nas diferentes fases de desenvolvimento do patógeno (YARULLINA; AKHATOVA; KASIMOVA, 2016). Em especial, nos fungos do gênero *Colletotrichum* foi demonstrado uma abundância de enzimas pectinolíticas e alta expressão dos genes que codificam essas enzimas durante a infecção do hospedeiro (GAN et al., 2012). Essas enzimas vêm sendo estudadas pelo seu envolvimento na patogenicidade de vários fungos, não somente do gênero *Colletotrichum* (SCHMITZ et al., 2019).

Devido ao número de enzimas produzidas pelo fungo, nem sempre é fácil determinar a importância de cada uma delas para o desenvolvimento da doença. Por conta disso, o emprego de técnicas como mutagênese sítio-dirigida e análise e expressão gênica diferencial auxilia no estudo funcional de genes relacionados com a patogenicidade (RUIZ; DI PIETRO; RONCERO, 2015). Utilizando análise de expressão gênica é possível observar o comportamento da expressão de determinados genes relacionados a patogenicidade em diferentes etapas da interação patógeno-hospedeiro (FONTENELLE et al., 2017). Enquanto que, por meio da mutagênese sítio-dirigida é possível inativar um ou mais genes de interesse e analisar o comportamento do fungo na interação com seu hospedeiro (RUIZ; DI PIETRO; RONCERO, 2015).

Um gene que codifica uma pectato liase, detectado por meio de hibridização subtrativa supressiva, foi diferencialmente expresso na interação de *C. lindemuthianum* com feijoeiro-comum (FONTENELLE et al., 2017). Esse mesmo gene foi avaliado funcionalmente por meio de mutação sítio-dirigida (CNOSSEN-FASSONI et al., 2013). O gene *pecC11*, que codifica uma pectato liase, mostrou-se importante na fase necrotrófica do patógeno, pois na sua ausência os sintomas típicos da doença foram reduzidos (CNOSSEN-FASSONI et al., 2013).

Para a análise funcional por mutação sítio dirigida é necessária a utilização de métodos de construção de cassetes de inativação e a transformação de fungos. Alguns métodos de construção são baseados em sucessivas clonagens (ROGERS et al., 2000) ou diferentes rodadas de PCR para a construção de um cassete de deleção, como no método *Split-marker* (CATLETT et al., 2003). Os cassetes construídos por esses métodos são utilizados para a transformação mediada por protoplastos (PMT). O método *One Step Construction of Agrobacterium-Recombination-ready-plasmids* (OSCAR) foi desenvolvido para uma rápida construção dos cassetes de deleção que possam ser utilizados para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (PAZ et al., 2011). A ATMT vem sendo utilizada para diversos fungos para a inativação de genes conhecidos por meio de mutagênese sítio dirigida ou para a descobertas de novos genes envolvidos na patogenicidade por meio de mutagênese aleatória (KORN et al., 2015).

Com isso, os principais objetivos desse trabalho foram analisar a expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* durante a interação com feijoeiro-comum por meio de qPCR e analisar funcionalmente genes candidatos por mutação sítio dirigida utilizando o sistema de transformação mediada por *A. tumefaciens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado A₂ 2-3 do fungo *C. lindemuthianum* pertencente a raça fisiológica 89 e a linhagem C58C1 da bactéria *A. tumefaciens* pertencentes à coleção do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos/BIOAGRO

da Universidade Federal de Viçosa. Para manutenção da cultura e esporulação das linhagens selvagem e mutantes, os fungos foram cultivados em meio YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) a 22 °C por seis dias. A *A. tumefaciens* foi mantida em LB com os antibióticos de seleção (rifampicina 50 µg/mL e 100 µg/mL espectinomicina). Foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* Top10 para a multiplicação dos plasmídeos.

Para extração de RNA, aproximadamente 10⁶ conídios/mL do isolado selvagem foram inoculados em meio mineral tamponado (MMT) pH 6,8 (K₂HPO₄ 6,98 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 5,44 g.L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,0 g.L⁻¹) suplementados com MgSO₄.7H₂O 1,1 g.L⁻¹ e glicose 10 g.L⁻¹ e cultivados sem agitação por 5 dias a 22 °C. Para extração de DNA para *Southern blot*, aproximadamente 10⁶ conídios/mL foram inoculados em meio GPYECH (glicose 20 g.L⁻¹; peptona 5 g.L⁻¹; extrato de levedura 1,0 g.L⁻¹; caseína hidrolisada 1,0 g.L⁻¹) e cultivados com agitação de 150 rpm por 4 dias a 22 °C.

O co-cultivo de *C. lindemuthianum* com *A. tumefaciens* foi realizado em meio GI sólido, composto por AB sais 1* (NH₄Cl 1 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,3 g.L⁻¹; KCl 0,15 g.L⁻¹), AB sais 2* (CaCl₂.2H₂O 10 mg.L⁻¹, FeSO₄ 2,5 mg.L⁻¹), GI fosfato (NaH₂PO₄.H₂O 0,69 g.L⁻¹), GI carbono (glicose 1,8 g.L⁻¹; glicerol 5 mL.L⁻¹), GI MES* pH 5,2 (MES 9,75 g.L⁻¹) e 1,5% de ágar. No meio GI líquido não é adicionado o GI fosfato. O (*) indica esterilização por filtração.

Extração de RNA e síntese de cDNA

As folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro-comum variedade Pérola com 10 dias pós-germinação foram inoculadas com suspensão de 10⁷ conídios/mL utilizando pincel. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 5 dias. A cada 24 horas foi realizado a coleta das folhas. Como controle negativo, o fungo foi crescido em MMT por 5 dias. Foram realizadas três repetições biológicas.

O RNA total das folhas de feijoeiro inoculadas com o fitopatógeno nos diferentes tempos e do fungo crescido em meio de cultura foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo os procedimentos descritos por Teixeira et al., (2014). As amostras de RNA foram tratadas com DNase RQ1 (Promega) e a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA tratado utilizando o kit

ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Seleção dos genes e avaliação da expressão diferencial por qPCR

Os genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* (dados não publicados) foram utilizados para mapeamento no transcriptoma em construção da interação do fungo *C. lindemuthianum* com feijoeiro-comum em diferentes tempos de infecção (dados não publicados). Os tempos de infecção foram 24 h, 72 h e 120 h após inoculação. Os genes que apresentaram níveis de expressão elevados em um dos tempos de infecção foram escolhidos para validação por PCR quantitativa. *Primers* específicos para esses genes foram desenhados utilizando a ferramenta online PRIMER3Plus (UNTERGASSER et al., 2007).

A PCR quantitativa foi realizada utilizando SYBR Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as leituras foram realizadas no equipamento CFX96 Touch TM Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD). Os *primers* utilizados para cada gene estão descritos na tabela suplementar 1. A eficiência e o coeficiente de determinação (R^2) de cada par de *primers* foram calculados. A quantificação relativa foi realizada pela curva padrão obtida para cada gene pela equação linear que relaciona Ct médio e log₁₀ da concentração de cDNA. O gene actina foi utilizado para a normalização dos níveis de expressão. A análise dos resultados foi realizada por meio de ANOVA e teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.).

Construção dos cassetes de deleção

O método *One Step Construction of Agrobacterium-Recombination-ready-plasmids* (OSCAR) (PAZ et al., 2011) foi utilizado para a construção dos cassetes de deleção em vetor binário. Aproximadamente 1 Kb das regiões flanqueadoras dos genes alvos foram amplificadas separadamente por meio de PCR utilizando *primers* com sequências de recombinação attB na região 5' (Tabela suplementar 2). Os produtos de PCR foram purificados utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Uma reação de 5 uL BP clonase foi montada utilizando 1 uL com 15-20 ng de uma mistura dos produtos de PCR purificados, 1 uL com 60 ng do plasmídeo pA-Hyg-OSCAR, 1 uL com 60 ng do plasmídeo pOSCAR, 1 uL do mix

de enzima BP clonase II (Invitrogen) e 1 uL de TE (Tris-HCL 10 mM; EDTA 5 mM). A reação foi incubada por 16 h a 25 °C. O produto da reação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 de acordo com Sambrook et al. (1989). A seleção foi realizada em LB contendo 100 µg/mL de espectinomicina. A checagem das construções foi realizada por digestão simultânea com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII* e por PCR.

Células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 foram transformadas com os vetores por choque térmico (WISE; LIU; BINNS, 2006). A seleção foi realizada em LB contendo 100 µg/mL de espectinomicina e 50 µg/mL de rifampicina.

Transformação de *C. lindemuthianum*

Para a transformação de *C. lindemuthianum* mediada por *A. tumefaciens*, as linhagens de *A. tumefaciens* C58C1 portando os diferentes cassetes de deleção foram cultivadas em 50 mL de LB contendo os antibióticos de seleção (100 µg/mL de espectinomicina e 50 µg/mL de rifampicina) por 16 h a 28 °C com agitação de 150 rpm até atingir 0,3 - 0,4 de D.O.₆₀₀. Uma alíquota foi retirada, centrifugada, o *pellet* ressuspendido em meio GI e ajustado para D.O.₆₀₀ 0,4.

Um volume de 150 uL da suspensão de células bacterinas foi misturado com 150 uL de suspensão contendo 10⁷ conídios/mL do fungo. Um volume de 100 uL da mistura foi inoculado sobre discos de papel celofane depositados em três placas de Petri com o meio GI ágar contendo 200 uM de acetoseringona. As placas foram incubadas a 22 °C por 48 h no escuro. Após o co-cultivo, o papel celofane contendo os inóculos foi invertido e transferido para placas com BDA suplementadas com 60 µg/mL de higromicina e 100 µg/mL de cefotaxima e incubados por 48 h a 22 °C. O papel celofane foi removido e sobre o meio de cultura foi adicionado uma fina camada de ágar-água contendo 60 µg/mL de higromicina e 100 µg/mL de cefotaxima. As placas foram novamente incubadas a 22 °C até o aparecimento das colônias transformantes.

Extração de DNA

Para a extração rápida de DNA para checagem por PCR, um disco de micélio dos transformantes em meio de cultura foi macerado em 500 uL do tampão de extração (SDS 0,2%; EDTA 50 mM) e incubado a 65 °C por 30 min. O macerado foi centrifugado por 15 min a 12.000 g. O sobrenadante foi

transferido para um novo tubo e adicionado 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 1,5 volume de isopropanol em relação ao volume inicial. A mistura foi agitada e centrifugada por 1 min a 12.000 g. O *pellet* foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 50 uL de água.

Para o *Southern blot*, o DNA total dos transformantes foi extraído seguindo a metodologia descrita por Specht et al. (1982), com modificações (TEIXEIRA et al., 2011).

Análise dos transformantes: PCR e Southern blot

A seleção inicial foi realizada por meio de PCR. Foram utilizando *primers* que amplificam parte da região codificadora e flanqueadora do gene alvo e região codificadora do gene *hph* (confere resistência a higromicina) e externa ao gene alvo.

Para a análise do perfil de integração do cassete de deleção, o DNA total dos transformantes foi clivado com enzima de restrição. Os fragmentos gerados foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %. O DNA foi transferido para a membrana Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989). Uma das regiões flanqueadoras foi utilizada como sonda e a marcação da sonda foi realizada utilizando o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science), seguindo-se as instruções do fabricante. A hibridização e detecção do sinal foi realizada utilizando o DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche Applied Science), seguindo as recomendações do fabricante.

Teste de patogenicidade e avaliação dos sintomas

O teste de patogenicidade foi realizado utilizando plantas e folhas destacadas de feijoeiro-comum da variedade Pérola. Uma suspensão com 10⁶ conídios/mL dos fungos mutantes e selvagem foram inoculadas na face abaxial e adaxial das folhas cotiledonares utilizando um pincel. Para controle negativo foi utilizado somente água. As plantas inoculadas foram acondicionadas em câmaras de nevoeiro e as folhas destacadas incubadas em BOD a 22 °C. O desenvolvimento dos sintomas foi acompanhado por 7 dias.

RESULTADOS

Expressão de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* na interação com o feijoeiro-comum

A análise da expressão gênica foi realizada para 12 genes que codificam diferentes pectinases putativas (Figura 1). Desses genes, seis codificam para pectato liase (*pecC12*, *pecC13*, *pecC14*, *pecC15*, *pecC16* e *pecC17*), três para poligalacturonase (*pgaC12*, *pgaC13* e *pgaC14*), dois para pectina metilesterases (*pmeC11* e *pmeC12*) e um para pectina liase (*pnlC13*). Os tempos de avaliação analisados referem-se a fases de infecção do patógeno na planta, sendo elas apressorial (24 h), biotrófica (48 h e 72 h) e necrotrófica (96 h e 120 h). Com exceção do gene *pgaC14*, para todos os demais genes foram detectados transcritos em todos os tempos analisados. A maioria dos genes analisados (*pecC12*, *pecC13*, *pecC14*, *pecC15*, *pecC17*, *pmeC11*, *pnlC13*, *pgaC12* e *pgaC14*) apresentaram expressão diferencial somente na fase necrotrófica. Nenhum gene analisado apresentou expressão diferencial na fase apressorial. Dois genes (*pecC16* e *pmeC12*) apresentaram expressão diferencial na fase biotrófica. Um gene (*pgaC13*) apresentou expressão diferencial na fase biotrófica e necrotrófica em relação a apressorial. Três genes (*pecC17*, *pgaC12* e *pnlC13*) apresentaram expressão diferencial quando o fungo foi crescido em meio mineral tamponado, apenas com glicose como única fonte de carbono.

Transformação de *C. lindemuthianum* e análise dos transformantes

Quatro genes (*pecC16*, *pecC17*, *pmeC12* e *pgaC13*) com perfil de expressão diferentes foram escolhidos para a análise funcional por meio de deleção. A transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) do fungo *C. lindemuthianum* com objetivo de deleção de genes é relatada pela primeira vez nesse trabalho. Após a transformação do fungo *C. lindemuthianum*, foram obtidos de 35 a 56 transformantes para cada gene alvo de deleção (Tabela 1). A checagem da deleção do gene alvo foi realizada inicialmente por PCR com os *primers* específicos para a amplificação parcial da região codificadora de cada gene (Figura 2). A presença de um amplicon indica que o transformante analisado não possuíam o gene alvo deletado. Em caso de ausência de banda, uma segunda PCR é realizada utilizando *primers* para amplificação de parte do gene *hph*,

confirmando a presença do cassete no locus correto. De todos os transformantes analisados por PCR para os quatro genes alvos, nenhum apresentou deleção do gene. Dessa forma, possivelmente todos os transformantes apresentaram integração ectópica do cassete de deleção.

Cinco transformantes para o gene *pgaC3* foram escolhidos aleatoriamente para a checagem da presença do cassete de deleção por meio de *Southern blot* (Figura 3). A enzima de restrição utilizada foi *SalI*. Como sonda foi utilizado a região 5' flanqueadora do gene, a mesma utilizada para a construção do cassete de deleção. Na linhagem selvagem era esperado uma única banda com 2,9 Kb de tamanho. Caso o gene *pgaC3* fosse substituído seria esperado a presença de uma única banda com 4,3 Kb de tamanho (Figura 3a). Todos os cinco transformantes analisados apresentaram uma banda correspondente ao gene *pgaC3* e uma segunda banda referente ao cassete de deleção (Figura 3b). Foi observada uma única integração do cassete de deleção, no entanto, todas as integrações foram ectópicas.

Uma nova ATMT foi realizada apenas com o cassete para a deleção do gene *pecC16*. Com a finalidade de obter um número maior de transformantes, o protocolo de transformação foi repetido utilizando 1,2 mL da mistura de conídios e bactéria distribuídos igualmente em 12 placas com o meio GI ágar para o co-cultivo. Após a segunda transformação do fungo *C. lindemuthianum* foram obtidos 154 transformantes para o gene *pecC16* (Tabela 1). Foi realizada a checagem da presença do gene *pecC16* por PCR para todos os transformantes obtidos (dados não mostrados). Apenas para dois transformantes ocorreu a ausência da amplificação do gene alvo. Uma segunda confirmação por PCR foi realizada para checar a presença do cassete de deleção no locus do gene alvo. O resultado da PCR indicou a substituição do gene *pecC16* pelo cassete de deleção (dados não mostrados). Foi realizada a checagem do número de cópias do cassete de deleção nos dois mutantes obtidos por *Southern blot* (Figura 3). A enzima de restrição utilizada foi *BamHI*. Como sonda, foi utilizado a região 3' flanqueadora do gene. Na linhagem selvagem era esperado uma única banda com 5,5 Kb de tamanho. Caso o gene *pecC16* fosse substituído seria esperado a presença de uma única banda com 3,5 Kb de tamanho (Figura 3c). Os dois transformantes analisados apresentaram somente uma cópia do cassete de

deleção no genoma, no locus do gene *pecC16*, confirmando a deleção do gene (Figura 3d).

Análise funcional do gene *pecC16* de *C. lindemuthianum*

Os mutantes $\Delta pecC16$ não apresentaram diferenças morfológicas da linhagem selvagem de *C. lindemuthianum*. A velocidade de crescimento e a esporulação dos mutantes $\Delta pecC16$ não foram afetadas (dados não mostrados).

Para avaliar o envolvimento do gene *pecC16* na patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*, os mutantes $\Delta pecC16$ e a linhagem selvagem foram submetidos ao teste de patogenicidade com plantas de feijoeiro da variedade Pérola, que é susceptível a antracnose, para a avaliação do desenvolvimento dos sintomas da doença (Figura 4). Os sintomas típicos da doença tiveram início a partir do quarto dia de inoculação, início da fase necrotrófica, tanto no experimente com as plantas como nas folhas destacadas para os mutantes $\Delta pecC16$ e o selvagem. No quinto dia após a inoculação as plantas e as folhas destacadas inoculadas com os mutantes $\Delta pecC16$ apresentaram sintomas da doença semelhantes aos sintomas observados com a inoculação do isolado selvagem. Os sintomas da doença provocados pelos mutantes $\Delta pecC16$ não apresentaram diferença em relação ao selvagem, mesmo após 8 dias de avaliação. O resultado indica que o gene *pecC16* não é essencial para a patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*.

DISCUSSÃO

Dos genes analisados por qPCR que codificam pectinases putativas no fungo *C. lindemuthianum*, foi observado a expressão de todos e que 75% destes são expressos diferencialmente durante a fase necrotrófica, que é a fase em que ocorre a maceração dos tecidos do hospedeiro pelas enzimas secretadas. O aumento de expressão de alguns desses genes na fase necrotrófica também foi observado em outros estudos em *Colletotrichum* spp. Dois genes que codificam poligalacturonases em *C. lindemuthianum*, *Clpg1* e *Clpg2* (*pgaC12*), foram analisados quanto a expressão durante a fase necrotrófica e apenas a expressão de *Clpg1* foi detectada (CENTIS et al., 1997). Dois genes que codificam pectato liase em *Colletotrichum gloeosporioides* (*pel-1* e *pel-2*) foram analisados quanto

a expressão e foi observado apenas expressão de *pel-2*, que ocorreu no final da fase biotrófica e continuou aumentando até a fase necrotrófica (SHIH; WEI; GOODWIN, 2000).

Onze dos doze genes analisados apresentaram expressão nos tempos iniciais de infecção, no entanto dois genes apresentaram um perfil de expressão diferencial somente na fase biotrófica. O produto desses genes pode estar envolvido nos processos iniciais da interação com o hospedeiro. Para iniciar o processo de infecção, não se sabe ao certo se somente a pressão de turgor exercida pelo apressório é suficiente para penetrar no tecido vegetal ou se enzimas líticas estão envolvidas nesse processo ou se ambos são necessários (CHEN et al., 2004; WALTON, 1994). Algumas enzimas podem participar desse processo, como pectinases e cutinases, mas ainda não foi demonstrado claramente os seus papéis (DICKMAN; PATIL; KOLATTUKUDY, 1982; DUMAS et al., 1999; KLEEMANN et al., 2008). Foi observado por alguns autores que o gene *Clpg2* (*pgaCl2*) que codifica uma poligalacturonase é detectada somente na fase apressorial, mas não nas fases tardias de colonização de feijoeiro-comum pelo fungo *C. lindemuthianum* (DUMAS et al., 1999; HERBERT et al., 2004). Por microscopia de imunofluorescência a presença de CLPG2 (PgaCl2) foi detectada na parede celular do fungo *C. lindemuthianum* durante a formação do apressório na interação com o seu hospedeiro (HERBERT et al., 2004). O promotor do gene *Clpg2* (*pgaCl2*) fusionado ao gene repórter GFP, permitiu a observação da expressão do gene repórter na fase inicial de desenvolvimento do apressório (DUMAS et al., 1999). Quando foi analisada a expressão desse gene *Clpg2* (*pgaCl2*) foi observado que ela ocorre principalmente na fase necrotrófica. Essa variação pode ser decorrente da linhagem do fungo utilizada ou do genótipo do hospedeiro, já que aparentemente raças patogênicas e não patogênicas de *C. lindemuthianum* apresentaram perfis de expressão diferentes para o gene *Clpn2* em fontes de carbono variáveis (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011).

A expressão de alguns genes (*pecC17*, *pgaCl2* e *pnIC13*) que codificam pectinases putativas em *C. lindemuthianum* em meio contendo apenas glicose, dá indício que o sistema de regulação não é o mesmo para todas os genes. Ao analisar a região promotora de genes que codificam para pectinases em *C. lindemuthianum*, foi observado variação na presença e quantidade de sítios

putativos de ligação para diferentes fatores transcricionais, incluindo CreA (dados não publicados). O fator transcricional CreA é responsável por regular a repressão de genes envolvidos no metabolismo de outras fontes de carbono na presença de glicose (CUBERO; SCAZZOCCHIO, 1994). Dos doze genes em que foram analisados a expressão, dois (*pgaC12* e *pnIC3*) não apresentam em sua região promotora sítios putativos de ligação para a proteína CreA em 500 pares de bases (pb) antes do códon de iniciação, e um (*pecC17*) não apresentou sítios putativos para CreA nos 1200 pb analisados. Isso pode sugerir que esses três genes não são regulados por CreA.

O método OSCAR de construção de cassetes utilizado é simples e menos laborioso do que outros métodos existentes e possibilita a utilização do vetor contendo o cassete de deleção tanto por ATMT quanto por PMT. A transformação de *C. lindemuthianum* para estudo funcional de genes por ATMT é realizada pela primeira vez neste trabalho, sendo utilizada para gerar mutantes dos genes escolhidos. Com o protocolo foi possível a obtenção de transformantes, no entanto, o número de transformantes obtidos nesse estudo foram baixos em comparação com outras espécies de *Colletotrichum* em relação ao número de transformantes obtidos pela quantidade de esporos do fungo utilizados (HAGHIGHI; SOLTANI; NAZERI, 2013; MARUTHACHALAM et al., 2008). Um maior número de transformantes poderá ser obtido por meio de modificações do protocolo utilizado para transformação por ATMT de *C. lindemuthianum*, como alteração do tempo de co-cultivo, da proporção de bactérias e conídios do fungo ou da concentração de acetoceringona. Dessa maneira, alguns trabalhos já foram realizados para diferentes fungos do gênero *Colletotrichum* visando aumentar a quantidade de transformantes obtidos pelo método ATMT (AUYONG; FORD; TAYLOR, 2012; HAGHIGHI; SOLTANI; NAZERI, 2013; MARUTHACHALAM et al., 2008; TALHINHAS et al., 2008).

Considerando o número de mutantes obtidos em relação ao número de transformantes analisados, o método ATMT para deleção em *C. lindemuthianum* não foi eficiente. Para três genes alvos, nenhum mutante foi detectado para número médio de 40 transformantes analisados. Somente para o gene *pecC16* foram obtidos dois mutantes, após a análise de mais de 180 transformantes, o que indica uma eficiência menor que 2%. Em *C. lindemuthianum*, o método split-marker para obtenção de cassetes de deleção e transformação por protoplastos

foi utilizado em outros trabalhos para estudo funcional de genes. Com o objetivo de inativar o gene *pecC1* de *C. lindemuthianum*, foram obtidos 16 transformantes e após a análise dos transformantes, três apresentaram uma única recombinação homóloga (CNOSSEN-FASSONI et al., 2013). No estudo de transportadores ABC (*abcC1*) e MFS (*mfsC1* e *mfsC2*) em *C. lindemuthianum*, foram obtidos um mutante com única integração homóloga de 14 transformantes analisados para o gene *abcC1*, um mutante com única integração homóloga de 10 transformantes analisados para o gene *mfsC1* e dois mutantes com única integração homóloga de 29 transformantes analisados para o gene *mfsC2* (SANTOS, 2012; PEREIRA et al., 2013). Para inativar o gene *sgeC1* que codifica um fator transcricional em *C. lindemuthianum*, foram obtidos e analisados 22 transformantes e identificado quatro mutantes (dados não publicados). Esse método parece ser mais eficiente em *C. lindemuthianum* em comparação com o método de ATMT.

Para alguns fungos a ATMT pode ser vantajosa pela alta eficiência de obtenção de mutantes. No trabalho que descreve o método OSCAR para construção de cassete de deleção, para o gene VDAG_02161 de 22 transformantes analisados do fungo *Verticillium dahliae*, sete apresentaram integração no locus correto e para o gene VDAG_09930 de 12 transformantes, três apresentaram integração no locus correto (PAZ et al., 2011). Em *Pestalotiopsis microspora*, 80% dos transformantes obtidos por ATMT e OSCAR indicaram possuir integração correta (YU et al., 2015). No entanto, no fungo *Metarhizium robertsii*, menos de 7% dos transformantes apresentaram integração homóloga utilizando a ATMT e OSCAR (XU et al., 2014). No fungo *Colletotrichum higginsianum*, o percentual de obtenção de integração homóloga na ATMT foi de 15% (KORN et al., 2015). Isso demonstra que o percentual de mutantes por transformantes é variável entre as espécies de fungos, até mesmo para fungos do mesmo gênero. Dos transformantes analisados por *Southern blot* nesse trabalho, todos apresentaram apenas uma cópia do cassete de deleção no genoma. Uma das vantagens da ATMT é o número de integrações do cassete de deleção no genoma do fungo, já que na ATMT ocorre com maior frequência a integração de uma única cópia do cassete (MICHIELSE et al., 2005).

Uma alternativa para aumentar o número de mutantes obtidos pelo método ATMT em *C. lindemuthianum* pode ser pela obtenção inicial de mutantes

para os genes *ku70* ou *ku80*. Os genes *ku70/80* são envolvidos no mecanismo de reparo por recombinação não homologa, e quando um destes genes é inativado, esse sistema de reparo é comprometido, dificultando a integração ectópica de DNA. Quando é utilizado um fungo mutante para os genes *ku70/80* para a inativação de um segundo gene de interesse, o número de transformantes por transformantes é aumentado. O número de integrações homólogas na linhagem do fungo *C. higginsianum* $\Delta Chku80$ foi de 60 a 90% (KORN et al., 2015) e em *M. robertsii* $\Delta MrKu70$ foi de mais de 90% (XU et al., 2014). A obtenção de um número menor de transformantes provavelmente não será um fator limitante para a deleção de genes em *C. lindemuthianum* se for utilizando mutantes para os genes *ku70/80*, visto o aumento na eficiência da integração homóloga.

Nenhuma alteração foi observada nos sintomas do hospedeiro infectado pelos diferentes mutantes $\Delta pecC16$ em relação ao selvagem, indicando que esse gene sozinho pode não ser essencial para a patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*. Em outros fungos foi observado que a inativação de determinadas pectinases inativadas não alterou os sintomas da doença, ou provocou uma redução destes. Clossen-Fassoni et al. (2013) demonstraram que a inativação do gene *pecC11* provocou uma redução nos sintomas causados pelo fungo *C. lindemuthianum* no feijoeiro-comum. No entanto, não houve uma completa abolição dos sintomas. Também foi observado em *Fusarium oxysporum*, que a deleção de duas poligalacturonases em mutantes distintos não interferiu na patogenicidade (RUIZ; DI PIETRO; RONCERO, 2015).

Como foi observado em *C. lindemuthianum*, mais de um gene codifica para enzimas com a mesma atividade. Assim como vários desses genes são expressos durante uma mesma fase. Com isso, o efeito observado da doença, a maceração dos tecidos vegetais, pode ser decorrente do somatório da atividade das diferentes enzimas durante a mesma fase. O sinergismo de enzimas é indicado para a completa virulência, como observado em *Fusarium graminearum* mutante para os genes *pg1* e *xyr1*, que codificam poligalacturonase e xilanase, respectivamente. Linhagens com uma única mutação para cada gene não apresentaram redução na agressividade. Quando foi obtido um duplo mutante, foi observado redução significativa na agressividade nas plantas avaliadas (PACCANARO et al., 2017). Similarmente, Em *F. oxysporum*, somente o duplo mutante para duas poligalacturonases, $\Delta pg1$ e

Δ pgx6, apresentou redução nos sintomas da doença no tomateiro (RUIZ; DI PIETRO; RONCERO, 2015). Alguns dos genes podem ser mais ou menos expressos, o que pode também indicar uma maior ou menor redução dos sintomas observados. Alguns genes que codificam poligalacturonases em *Aspergillus niger* foram mais expressos na linhagem mutante do que no tipo selvagem, sugerindo que a deleção de um gene específico pode resultar em maior expressão de outros genes que codificam enzimas com a mesma atividade (LIU et al., 2017).

A análise de expressão diferencial de genes em *C. lindemuthianum* pode funcionar como um norte para a escolha de genes candidatos a estudo funcional. Os diferentes métodos de construção de cassetes de deleção e métodos de transformação de fungos devem ser testados e avaliados em um mesmo fungo que é estudado com a finalidade de encontrar o melhor sistema. A análise funcional de genes permite a identificação de genes que sejam importantes ou não para a patogenicidade de fungos, como em *C. lindemuthianum*.

REFERÊNCIAS

AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 372–382, 2012.

CATLETT, N. L. et al. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genetics Reports**, v. 50, n. 1, p. 9–11, 2003.

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**, v. 10, n. 6, p. 769–775, 1997.

CHEN, Z. et al. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1199–1208, 2004.

CNOSSEN-FASSONI, A. et al. The pectate lyase encoded by the pecCl1 gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 461–470, 2013.

CUBERO, B.; SCAZZOCCHIO, C. sites CREA-mediated. **Embo Journal**, v. 13, n. 2, p. 407–415, 1994.

DA SILVA, L. L. et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891–1904, 2020.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Purification, characterization and rôle in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 333–347, 1982.

DOS SANTOS, L. V. et al. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1087–1095, 2012.

DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1769–1771, 1999.

FONTENELLE, M. R. et al. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 3, p. 653–670, 2017.

GAN, P. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**, v. 197, p. 1236–1249, 2012.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by oomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013.

GRAVELAT, F. N.; ASKEW, D. S.; SHEPPARD, D. C. Targeted gene deletion in *Aspergillus fumigatus* using the hygromycin-resistance split-marker approach. In: BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M. **Host-fungus interactions**: methods and protocols. Springer Science, 2012. p. 119-130.

HAGHIGHI, M. Y.; SOLTANI, J.; NAZERI, S. A survey on optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 35–41, 2013.

HERBERT, C. et al. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 2, p. 140–147, 2004.

KLEEMANN, J. et al. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. **Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 1204–1217, 2008.

KORN, M. et al. A genetic screen for pathogenicity genes in the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* identifies the plasma membrane proton pump Pma2 required for host penetration. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–35,

2015.

KUMAR, A. et al. Epidemiology of bean anthracnose under sub-humid mid hills zone of Himachal Pradesh. **Indian Phytopathology**, v. 52, n. 4, p. 393–397, 1999.

LARA-MÁRQUEZ, A. et al. Cloning and characterization of a pectin lyase gene from *Colletotrichum lindemuthianum* and comparative phylogenetic/structural analyses with genes from phytopathogenic and saprophytic/opportunistic microorganisms. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 260, 2011.

LIU, C. Q. et al. Polygalacturonase gene *pgxB* in *Aspergillus niger* is a virulence factor in apple fruit. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 43, 2017.

MARUTHACHALAM, K. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 234–241, 2008.

MICHIELSE, C. B. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, n. 1, p. 1–17, 2005.

MUIMBA-KANKOLONGO, A. Leguminous Crops. *in*: MUIMBA-KANKOLONGO, A. **Food crop production by smallholder farmers in Southern Africa**. Academic Press, 2018. p. 173-203.

MYERS, J. R.; KMIECIK, K. Common bean: economic importance and relevance to biological science research. *In*: VEGA M. P., SANTALLA M., MARSOLAIS F. **The common bean genome**. Compendium of plant genomes. Springer, 2017. p. 1–20.

PACCANARO, M. C. et al. Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 11, p. 886–895, 2017.

PAZ, Z. et al. One Step Construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 7, p. 677–684, 2011.

PEREIRA, M. F. et al. Beginning to understand the role of sugar carriers in *Colletotrichum lindemuthianum*: the function of the gene *msf1*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, 2013.

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

ROGERS, L. M. et al. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97,

n. 17, p. 9813–9818, 2000.

RUIZ, G. B.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Combined action of the major secreted exo- and endopolygalacturonases is required for full virulence of *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 339–353, 2015.

SANTOS, G. Q. **Análise funcional de genes que codificam transportadores em *Colletotrichum lindemuthianum***. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

SCHMITZ, K. et al. Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2507–2524, 2019.

SHIH, J.; WEI, Y.; GOODWIN, P. H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, v. 243, n. 1–2, p. 139–150, 2000.

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.

TALHINHAS, P. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. **Molecular Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 57–67, 2008.

TEIXEIRA, J. A. et al. Improved pectinase production in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 818–825, 2011.

TEIXEIRA, J. A. et al. Genome organization and assessment of high copy number and increased expression of pectinolytic genes from *Penicillium griseoroseum*: a potential heterologous system for protein production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1571–1580, 2014.

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

VILLA-RIVERA, M. G. et al. The role of virulence factors in the pathogenicity of *Colletotrichum* sp. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 1005–1018, 2016.

WALTON, J. D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, n. 4, p. 1113–1118, 1994.

WISE, A. A.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 343, p. 43–53, 2006.

XU, C. et al. A high-throughput gene disruption methodology for the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

YARULLINA, L. G.; AKHATOVA, A. R.; KASIMOVA, R. I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant–pathogen interactions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, n. 2, p. 193–203, 2016.

YU, X. et al. High frequency of homologous gene disruption by single-stranded DNA in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2151–2160, 2015.

Tabela 1. Número de transformantes obtidos em cada transformação.

Evento de transformação	Gene	Número de transformantes obtidos e analisados	Número mutantes detectados
1 ^o	<i>pecC16</i>	38	0
	<i>pecC17</i>	35	0
	<i>pmeC12</i>	56	0
	<i>pgaC13</i>	45	0
2 ^o	<i>pecC16</i>	154	2

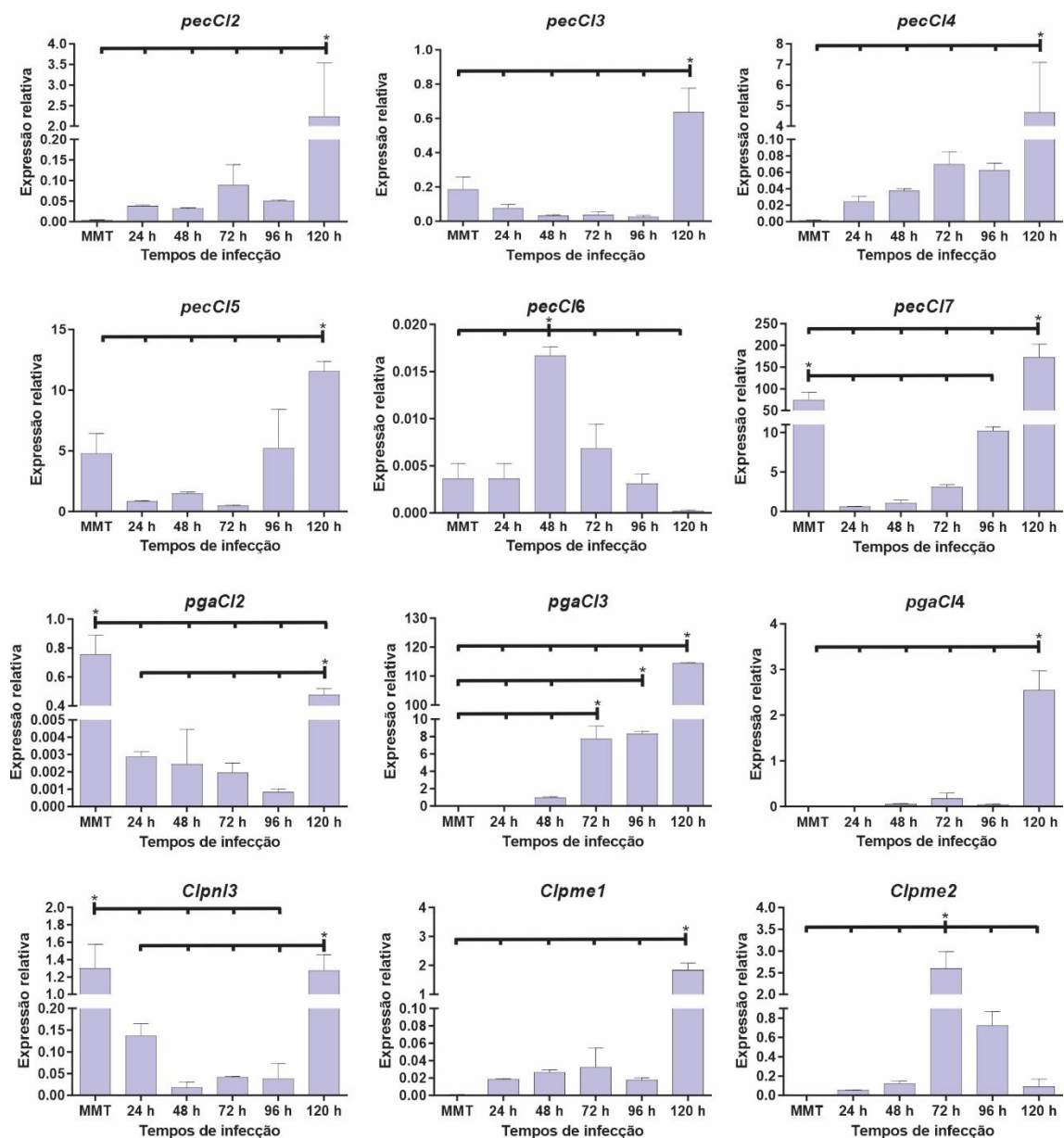


Figura 1. Expressão de genes de *C. lindemuthianum* que codificam pectinases putativas durante a interação do fungo com o hospedeiro feijoeiro-comum em diferentes tempos de infecção. (*) indica os tratamentos em que a expressão foi considerada diferencial por meio de ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. MMT: meio mineral tamponado.

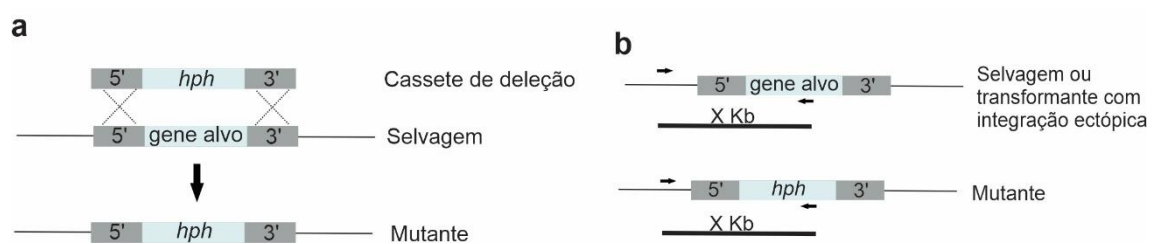


Figura 2. Esquema de deleção e checagem de deleção por PCR. (a) Substituição do gene de interesse no isolado selvagem pelo cassete de deleção. (b) Regiões amplificadas por PCR para checagem dos transformantes. Gene *hph* (higromicina-B- fosfotransferase) confere resistência a higromicina.

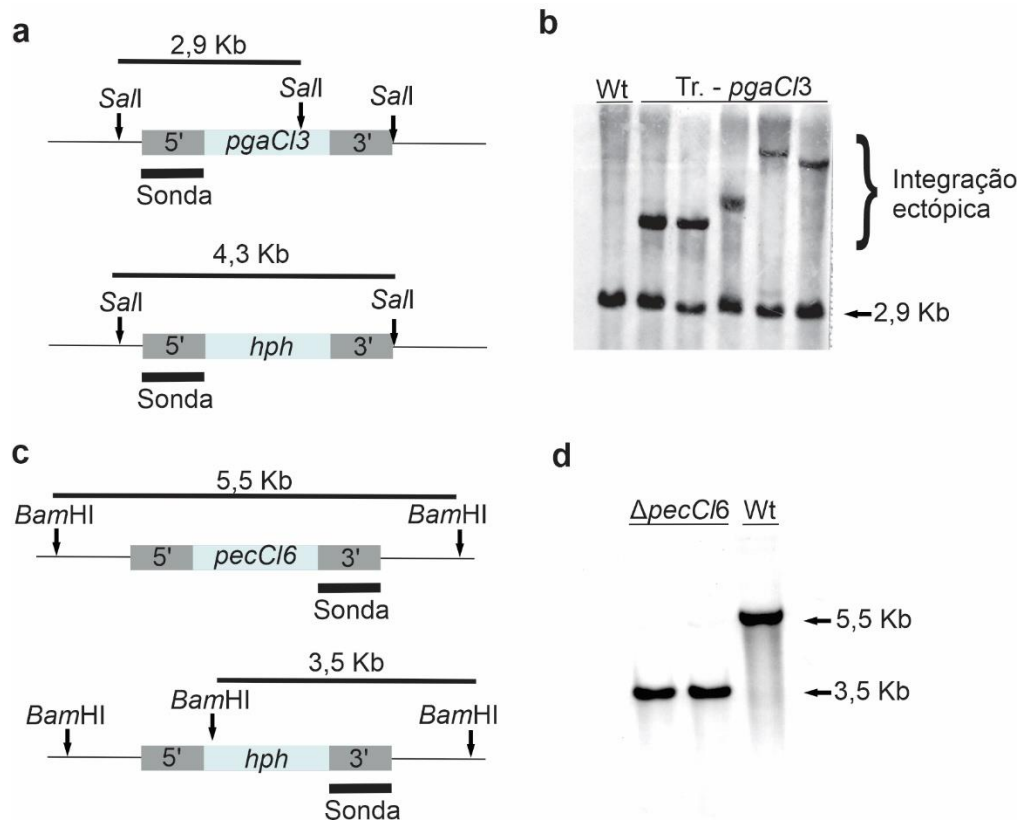


Figura 3. Avaliação do número de cópias do cassete de deleção no genoma dos transformantes. (a e c) Representação dos sítios de reconhecimento para a enzimas de restrição no genoma das linhagens utilizadas para hibridização e tamanho de fragmentos esperados após a clivagem. (b e d) Perfil de integração do cassete de deleção no genoma dos fungos analisados. Tr: transformantes para o gene alvo *pgaC13*. Gene *hph* (higromicina-B- fosfotransferase) confere resistência a higromicina.

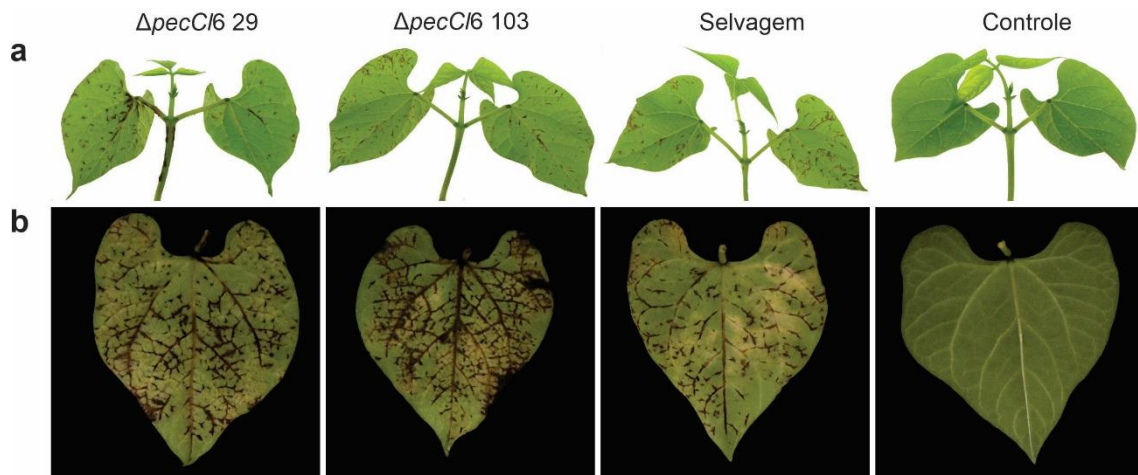


Figura 4. Patogenicidade de linhagens mutantes e selvagem de *C. lindemuthianum* em feijoeiro-comum. (a) Plantas mantidas em câmara de nevoeiro. (b) Folhas destacadas mantidas em BOD.

Tabela suplementar 1. Primers usados na análise da expressão gênica.

Primers	Genes	Equação da reta	E (%)	R ²
Act-F e Act-R	<i>actC1</i>	$y = -3,4138x + 29,68$	96,3	0,994
RT-pecC12-F e RT-pecC12-R	<i>pecC12</i>	$y = -3,1287x + 30,245$	108,7	0,977
RT-pecC14-F e RT-pecC13-R	<i>pecC13</i>	$y = -3,3067x + 29,1$	100,6	0,988
RT-pecC14-F e RT-pecC14-R	<i>pecC14</i>	$y = -3,219x + 28,513$	104,5	0,988
RT-pecC15-F e RT-pecC15-R	<i>pecC15</i>	$y = -3,2295x + 28,977$	104,0	0,985
RT-pecC16-F e RT-pecC16-R	<i>pecC16</i>	$Y = -3,26x + 23,085$	102,7	0,987
RT-pecC17-F e RT-pecC17-R	<i>pecC17</i>	$y = -3,4359x + 30,888$	95,5	0,987
RT-pmeC11-F e RT-pmeC11-R	<i>pmeC11</i>	$y = -3,0964x + 29,286$	110,4	0,954
RT-pmeC11-F e RT-pmeC11-R	<i>pmeC12</i>	$y = -3,2146x + 29,306$	104,7	0,992
RT-pgaC12-F e RT-pgaC12-R	<i>pgaC12</i>	$y = -3,2083x + 28,239$	105,0	0,954
RT-pgaC13-F e RT-pgaC13-R	<i>pgaC13</i>	$y = -3,1253x + 28,174$	108,9	0,954
RT-pgaC14-F e RT-pgaC14-R	<i>pgaC14</i>	$y = -3,3579x + 30,361$	98,5	0,975
RT-pnlC13-F e RT-pnlC13-R	<i>pnlC13</i>	$y = -3,3854x + 31,364$	97,4	0,992

E: eficiência dos primers.

Tabela suplementar 2. *Primers* utilizados para a construção do cassete de deleção pelo método OSCAR e confirmação de deleção.

Gene	Fl.	Primer	Sequência (5' -> 3')	Tamanho (pb)
<i>pecC16</i>	5'	pecC16-attB2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAAGGCCTTTGCGAGTCAATCA</u>	959
		pecC16-attB1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTTCGAGAAGCGTTGTCGTTCA</u>	
	3'	pecC16-attB4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTGC GGCGAGTTCCTGTTTAT</u>	1091
		pecC16-attB3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTTATTGAGCGGGCGGATTCTC</u>	
<i>pecC17</i>	5'	pecC17-attB2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAACGAAGGCTGTTCTTGTGTGC</u>	970
		pecC17-attB1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGACGCTGCAATATGGGCTTG</u>	
	3'	pecC17-attB4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTGGGAATGACGAGAGCGCAAT</u>	955
		pecC17-attB3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTGGGATGAATTGCGCACGTTT</u>	
<i>pmeC12</i>	5'	Clpme2-attB2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAACTACGCACGAAGCAAATCGG</u>	1056
		Clpme2-attB1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGCTGAGCTGGGACAAAGGAT</u>	
	3'	Clpme2-attB4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTACCAGCTTCCAACAGATACCAG</u>	950
		Clpme2-attB3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTCAACATCGTCACAGGAGGCA</u>	
<i>pgaC13</i>	5'	Clpg3-attB2r	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGAAAGATCGTCAACGTCATGCTGC</u>	1089
		Clpg3-attB1r	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTCTGGTGTCAACGACCATCCA</u>	
	3'	Clpg3-attB4	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTTCGCATACGTGTTGGTTGGA</u>	911
		Clpg3-attB3	<u>GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTTGGCTTCGTCGACAACATCA</u>	
<i>pecC16</i>	5'	pecC16f-conf	TCAAGCTCATTGACAGTCGTG	

Fl: Região flanqueadora do gene. As sequências sublinhadas são os sítios de recombinação attB.

CONCLUSÕES

Por meio da análise das sequências de amplicons ITS foi possível acessar de forma mais eficiente a diversidade de fungos endofíticos e rizosféricos do feijoeiro-comum.

Um número elevado de gêneros de fungos endofíticos do feijoeiro-comum foram identificados em comparação com métodos já utilizados anteriormente.

A diversidade de fungos variou mais entre os órgãos e rizosfera da mesma planta do que entre as variedades vegetais.

O fungo *C. lindemuthianum* apresenta elevado número de pectinases em comparação com todos os micro-organismos analisados.

A presença de diferentes tipos de genes que codificam pectinases e a detecção da atividade de diferentes pectinases indica a capacidade do hospedeiro de degradar o substrato complexo que é a pectina.

As pectinases putativas com mesmo modo de ação apresentam características variáveis.

A presença de sítios de ligação para diferentes fatores transcricionais conhecidos, indica que a regulação de genes que codificam pectinases em *C. lindemuthianum* é complexa.

A expressão dos genes que codificam pectinases mostra a importância dessas enzimas durante a interação de *C. lindemuthianum* com o feijoeiro-comum.

O sistema de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* não foi eficiente para a deleção de genes em *C. lindemuthianum*.

O gene *pecC16* não é essencial para a patogenicidade de *C. lindemuthianum*.