

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

RAÍSSA FERREIRA MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DICER-LIKE EM
*Colletotrichum lindemuthianum***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

RAÍSSA FERREIRA MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DICER-LIKE EM
*Colletotrichum lindemuthianum***

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

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientador: Mateus Ferreira Santana

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

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

T

M188c
2022
Magalhães, Raíssa Ferreira, 1997-
Caracterização funcional das proteínas Dicer-like em
Colletotrichum lindemuthianum / Raíssa Ferreira Magalhães. –
Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (53 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 46-51.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.056>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Colletotrichum lindemuthianum* - Genética. 2. Ácido
ribonucleico - Síntese. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Feijão -
Doenças e pragas. 5. Antracnose. I. Queiroz, Marisa Viera de,
1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.135

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

RAÍSSA FERREIRA MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DICER-LIKE EM
*Colletotrichum lindemuthianum***

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

APROVADA: 30 de novembro de 2022.

Assentimento:



Raíssa Ferreira Magalhães
Autora



Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais e meu irmão, que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar presente na minha vida em todos os momentos.

À minha família, meu pai Eduardo, minha mãe Patrícia e meu irmão Victor por me apoiarem em toda e qualquer decisão, por estarem ao meu lado, por nunca me deixarem sozinha apesar de estar longe grande parte do tempo. Por estarem sempre torcendo e rezando por mim. Pelo apoio que nunca me faltou. Amo vocês.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, ao Departamento de Microbiologia e à Universidade Federal de Viçosa, por toda experiência, oportunidade e suporte.

Aos professores que tive a oportunidade de adquirir tanto conhecimento, em especial ao professor Mateus, que sempre foi muito solícito ao me coorientar.

À professora Marisa Vieira de Queiroz pela orientação, por estar sempre presente, por ter me acolhido desde a graduação e por todo conhecimento transmitido.

À Patrícia e ao Leandro por toda ajuda, contribuição e disponibilidade em qualquer momento que eu precisasse.

A todos do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, de outros laboratórios do terceiro andar do BIOAGRO e das disciplinas. Em especial ao Felipe, Mirele, Brunas, Janaína, Shelly, Alexia, Osiel, Rafael, Ediones e Mísia, pela parceria, convivência, troca de conhecimentos e amizade que certamente ficará para sempre.

Ao pessoal de outros laboratórios e amigos de fora que contribuíram de alguma forma, em especial ao Eduardo, por toda parceria e todos os tutoriais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. E ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI).

Às empresas de fomento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte disso, obrigada!

BIOGRAFIA

RAÍSSA FERREIRA MAGALHÃES, filha de Eduardo Luís Magalhães e Patrícia Helena Ferreira Magalhães, nasceu em 27 de fevereiro de 1997 em Santa Bárbara, MG.

Sua graduação foi iniciada em 2015, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, e foi concluída em janeiro de 2020, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em novembro do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, também na UFV, defendendo a dissertação em novembro de 2022.

RESUMO

MAGALHÃES, Raíssa Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Caracterização funcional das proteínas Dicer-like em *Colletotrichum lindemuthianum***. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientador: Mateus Ferreira Santana.

A importância social, agrícola e econômica do feijoeiro-comum demanda a sustentabilidade de alta produtividade da cultura. A antracnose do feijoeiro-comum, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é responsável por perdas expressivas na produção de feijão. Esse fungo é conhecido por possuir alta variabilidade genética, refletida no grande número de raças fisiológicas, o que dificulta a manutenção de cultivares resistentes a longo prazo. Fungos fitopatogênicos secretam moléculas efetoras para inativar ou escapar aos mecanismos de defesa da planta hospedeira e pequenos RNAs (sRNAs) podem atuar como efetores. A síntese da maior parte desses sRNAs descritos em fungos exige a participação de proteínas Dicer-like (DCLs), que fazem parte do mecanismo de RNA de interferência (RNAi). *Colletotrichum lindemuthianum* possui um sistema de silenciamento gênico mediado por RNAi e foi observada a presença de dois genes (*dcl1* e *dcl2*) que codificam proteínas Dicer-like (DCL1 e DCL2). Para avaliar o papel dessas proteínas no desenvolvimento e na patogenicidade de *C. lindemuthianum*, os genes *dcl1* e *dcl2* foram deletados utilizando a técnica *Split Marker*, sendo os mutantes simples analisados e comparados ao isolado tipo selvagem quanto ao crescimento vegetativo, conidiação, formação de tubos de anastomose de conídios (CATs), formação de tubos germinativos (TG) e patogenicidade. Foram obtidos 39 transformantes para *dcl1* e 52 transformantes para *dcl2*, os quais foram analisados por *Southern blot*. Nos mutantes simples selecionados com perda de função de *dcl1* ($\Delta dcl1$) ou de *dcl2* ($\Delta dcl2$), não foram observadas alterações significativas no crescimento, na produção e germinação de conídios ou na agressividade de *C. lindemuthianum*. Por outro lado, foi observada diminuição na formação de CATs, tanto em $\Delta dcl1$ quanto em $\Delta dcl2$. Com a obtenção do mutante duplo $\Delta dcl1\Delta dcl2$, foram feitos testes preliminares que demonstram redução dos sintomas da antracnose nas folhas de feijoeiro-comum, bem como na formação de conídios. Assim, sugere-se que esses genes possuam redundância funcional e que pequenos RNAs que tiveram sua formação diminuída devido à falta

das proteínas DCLs, que são capazes de processá-los, podem atuar como moléculas efetoras em *C. lindemuthianum*, contribuindo para a sua patogenicidade.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*. Dicer-like. sRNAs. RNAi.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Raíssa Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2022. **Functional characterization of Dicer-like proteins in *Colletotrichum lindemuthianum***. Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisor: Mateus Ferreira Santana.

The social, agricultural and economic importance of the common bean demands the sustainability of high productivity of the crop. Common bean anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is responsible for significant losses in bean production. This fungus is known to have high genetic variability, reflected in the large number of physiological races, which makes it difficult to maintain long-term resistant cultivars. Phytopathogenic fungi secrete effector molecules to inactivate or evade host plant defense mechanisms and small RNAs (sRNAs) can act as effectors. The synthesis of most of these sRNAs described in fungi requires the participation of Dicer-like proteins (DCLs), which are part of the RNA interference mechanism (RNAi). *Colletotrichum lindemuthianum* has an RNAi-mediated gene silencing system and the presence of two genes (*dcl1* and *dcl2*) that encode Dicer-like proteins (DCL1 and DCL2) was observed. To evaluate the role of these proteins in the development and pathogenicity of *C. lindemuthianum*, the *dcl1* and *dcl2* genes were deleted using the Split Marker technique, and the simple mutants were analyzed and compared to the wild-type isolate in terms of vegetative growth, conidiation, tube formation of conidial anastomosis (CATs), germ tube formation (TG) and pathogenicity. 39 transformants were obtained for *dcl1* and 52 transformants for *dcl2*, which were analyzed by Southern blot. In single mutants selected with *dcl1* ($\Delta dcl1$) or *dcl2* ($\Delta dcl2$) loss of function, no significant alterations were observed in the growth, production and germination of conidia or in the aggressiveness of *C. lindemuthianum*. On the other hand, a decrease in the formation of CATs was observed, both in $\Delta dcl1$ and in $\Delta dcl2$. By obtaining the double mutant $\Delta dcl1\Delta dcl2$, preliminary tests were carried out that demonstrate a reduction in the symptoms of anthracnose in common bean leaves, as well as in the formation of conidia. Thus, it is suggested that these genes have functional redundancy and that small RNAs that had their formation reduced due to the lack of DCLs proteins, which are capable of processing them, may act as effector molecules in *C. lindemuthianum*, contributing to its pathogenicity.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*. Dicer-like. sRNAs. RNAi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Microrganismo, condições de cultivo e hospedeiro utilizado.....	17
2.2 Análise das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes <i>dcl1</i> e <i>dcl2</i> .	18
2.3 Construção dos cassetes para a deleção dos genes <i>dcl1</i> e <i>dcl2</i>	18
2.4 Transformação genética de <i>C. lindemuthianum</i>	22
2.5 Extração de DNA e confirmação dos mutantes por PCR.....	23
2.6 Caracterização genética dos transformantes por <i>Southern blot</i>	23
2.7 Análises fenotípicas	24
2.7.1 Ensaio de desenvolvimento e conidiação	24
2.7.2 Anastomose de conídios.....	25
2.7.3 Germinação de conídios	25
2.8 Ensaio de patogenicidade	26
3. RESULTADOS	27
3.1 Análise <i>in silico</i> dos genes <i>dcl1</i> e <i>dcl2</i> de <i>C. lindemuthianum</i>	27
3.2 Análise filogenética das proteínas codificadas pelos genes <i>dcl1</i> e <i>dcl2</i>	29
3.3 Isolamento dos mutantes $\Delta dcl1$, $\Delta dcl2$ e $\Delta dcl1\Delta dcl2$	31
3.4 Papel das proteínas Dicer-like no crescimento e conidiação de <i>C. lindemuthianum</i>	36
3.5 Avaliação dos tubos de anastomose de conídios (CATs) nos mutantes $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ de <i>C. lindemuthianum</i>	37
3.6 Papel das proteínas Dicer-like na germinação de conídios em <i>C. lindemuthianum</i>	38
3.7 Papel das proteínas Dicer-like na patogenicidade de <i>C. lindemuthianum</i>	38
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	52

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) é uma cultura muito importante, principalmente por produzir um alimento rico em proteínas, vitaminas e carboidratos complexos (PUNIA et al., 2020; REHMAN; SALARIYA; ZAFAR, 2001). Essas propriedades do feijão levam a relevância do seu consumo, sobretudo quando se fala do combate à desnutrição (BROUGHTON et al., 2003). No Brasil, o feijão está presente no cotidiano da maioria dos brasileiros, onde estima-se que o consumo no país será de 2,85 milhões de toneladas em 2022 (CONAB, 2022). O país é o terceiro maior produtor de feijão comum do mundo, sendo a maior parte da produção resultante da agricultura familiar, além disso o feijoeiro também é importante para a rotação de culturas (REINPRECHT et al., 2020; FAOSTAT, 2021; PRONAF, 2020). Isto posto, é fundamental manter a boa produtividade e qualidade da cultura para que o consumo do grão não seja prejudicado.

A manutenção do alto rendimento de grãos do feijoeiro é ameaçada por fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas por microrganismos e as pragas agrícolas são os principais problemas da cultura (JIA et al., 2022). Doenças microbianas podem causar perdas severas na produtividade em todo o mundo como o crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, o vírus do mosaico comum do feijão (BCMV) e as doenças fúngicas como a antracnose causada pelo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara (MEZIADI et al., 2016; NAY et al., 2019; SINGH; SCHWARTZ, 2010). Em se tratando da antracnose, condições favoráveis à infecção como locais úmidos e a utilização de cultivares suscetíveis, podem comprometer totalmente o rendimento dos grãos. (GILLARD; RANATUNGA, 2013; SINGH; SCHWARTZ, 2010).

O ascomiceto *C. lindemuthianum* é um patógeno hemibiotrófico no qual em um primeiro estágio de infecção, o conídio germina produzindo o apressório que quando maduro, expande uma hifa para penetrar a epiderme da planta que, em seguida, forma uma vesícula de infecção de onde saem as hifas primárias, que se encontram entre a parede celular e a membrana plasmática da célula, caracterizando sua fase biotrófica, ou seja, utilizam as células do hospedeiro sem causar danos (ALVAREZ-DIAZ et al., 2022). Posteriormente, hifas secundárias necrotróficas são formadas e o tecido da

planta é macerado com o auxílio de enzimas liberadas pelo fungo que são importantes para o desenvolvimento da doença (DA SILVA et al., 2022). Na forma reprodutiva mais comum, a assexuada, são produzidos os acérvulos onde os conídios são formados. Na forma menos comum, a sexuada, os esporos sexuais são formados dentro de uma estrutura chamada asco localizadas nos peritécios, os corpos de frutificação, que ao serem liberados, disseminam a doença infectando plantas nas quais foram deixados (DA SILVA et al., 2020; O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Nessa fase é possível visualizar os sintomas da antracnose em toda a parte aérea do feijoeiro, caracterizados por nervuras escurecidas nas folhas, manchas arredondadas de coloração marrom no caule e nas vagens, com produção de conídios alaranjados. Por afetar o sistema vascular, dentre os danos é observado uma redução da condutividade hidráulica da planta levando à murcha e, eventualmente, à morte da planta (PADDER et al., 2017).

Um dos principais fatores que dificultam o manejo da antracnose é a alta variabilidade genética, sendo já descritas mais de cem raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; PADDER et al., 2017). Diferentes mecanismos são responsáveis pelo surgimento de novas raças de *C. lindemuthianum*, dentre esses a anastomose de conídios pode ter uma importante participação (PINTO et al., 2012).

Os tubos de anastomose de conídios (CATs) foram descritos primeiramente em *C. lindemuthianum* e são hifas especializadas que permitem a comunicação entre os conídios (ROCA et al., 2003). Já foram relatadas fusões dos CATs em fungos filamentosos que podem estar envolvidas na troca genética interespecífica, como em *Colletotrichum gloesporioides* e *C. siamense*, o que pode gerar variabilidade genética nessas espécies (MEHTA; BAGHELA, 2021). Em espécies de outros gêneros, como *Fusarium oxysporum*, também já foi relatada a fusão de CATs e mostrado que os descendentes gerados pela fusão dos tubos, poderiam manifestar fenótipos diferentes das cepas geradoras (MEHTA et al., 2021; SHAHI et al., 2016). Os CATs em *C. lindemuthianum* são importantes para a passagem de núcleos, citoplasma e organelas entre os conídios, podendo ser um fator considerável de variabilidade genética na espécie provocando alterações na sua virulência e podendo ser um fator gerador de novas raças fisiológicas na espécie (DA SILVA et al., 2020; ISHIKAWA et al., 2012; ROCA et al., 2004).

Apesar da alta capacidade de infecção dos fungos fitopatogênicos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa. Nas plantas encontram-se duas linhas de defesa contra esses fungos, a primeira é acionada quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos por proteínas específicas que são os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), levando a imunidade desencadeada por PAMP (PTI) (DODDS; RATHJEN, 2010). Essa primeira fonte de defesa é muito importante na redução da ocupação de fitopatógenos que não são adaptados (YUAN et al., 2021). A segunda linha de defesa da planta é o reconhecimento de moléculas de virulência do patógeno, os efetores, que é a imunidade desencadeada por efector (ETI). Efetores são moléculas capazes de interferir e manipular o sistema imune do hospedeiro, facilitando a infecção e/ou desencadeando respostas de defesa (ELLIS et al., 2009; HOGENHOUT et al., 2009). O reconhecimento dos efetores se dá por receptores de repetição rica em leucina (NLRs) (JONES; DANG, 2006). Essa segunda defesa pode ser considerada mais vigorosa quando o fitopatógeno é habituado ao hospedeiro (PRUITT; GUST; NÜRNBERGER, 2021).

Os fungos fitopatogênicos secretam moléculas efetoras para inativar ou escapar dos mecanismos de defesa da planta hospedeira (JONGE et al., 2011). Patógenos que possuem o estilo de vida hemibiotrófico podem secretar diversos tipos de moléculas efetoras, tanto moléculas que atuam na imunidade inata do hospedeiro na fase biotrófica da infecção, quanto as que causam morte celular durante a fase necrotrófica (HORBACH et al., 2011; TARIQJAVEED et al., 2021). Nos últimos tempos, as moléculas efetoras vem sendo muito identificadas (NABI et al., 2022) e os candidatos a efetores podem ser muito diversos e possuir natureza não proteica, como os pequenos RNAs (sRNAs).

Pequenos RNAs de fungos fitopatogênicos podem atuar como efetores, sendo produzidos pelo patógeno e secretados durante a associação com a planta, auxiliando a infecção (WEIBERG et al., 2013). Pequenos RNAs possuem entre 20 e 30 nucleotídeos e são conhecidos por participarem de diversas funções nas células vivas como regulação da expressão gênica, defesa contra elementos invasores de DNA e podem regular a interação planta-patógeno (HUANG et al., 2019; LI et al., 2013; WANG et al., 2015). Os sRNAs de fungos podem estar relacionados com o mecanismo de RNA de interferência (RNAi), processo onde esses sRNAs estão

envolvidos no silenciamento gênico, guiando o silenciamento transcricional ou pós transcricional (WERNER et al., 2021).

O RNAi em fungos foi descrito pela primeira vez em *Neurospora crassa*, quando esse mecanismo foi chamado de *quelling* (ROMANO; MACINO, 1992). A descoberta permitiu que estudos genéticos com esse organismo modelo esclarecessem a maquinaria do RNAi (NICOLAS; GARRE, 2016). O RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico mediado por um RNA dupla fita (dsRNA) e desencadeia um processo de degradação específica do mRNA alvo (NOGUEIRA et al., 2019), onde sua função inicial foi relatada como mecanismo de defesa contra ácidos nucleicos invasivos como transposons e vírus (NICOLAS; GARRE, 2016). A maquinaria de RNAi é considerada conservada em fungos filamentosos, contando com a participação das seguintes proteínas: QDE-1 (RNA polimerase dependente de RNA); QDE-2 (proteína argonauta) (COGONI; MACINO, 1997); DCL1 e DCL2 (proteínas Dicer-like) (CATALANOTTO et al., 2004). A conservação e a ocorrência da maquinaria na maioria das espécies sugere a importância das proteínas de RNAi em fungos filamentosos e dos seus papéis na regulação gênica e na defesa contra ácidos nucleicos adversos (NICOLAS; GARRE, 2016; ZHOU et al., 2022). Essa maquinaria faz parte de um complexo de silenciamento mediado por RNA (RISC) (CARMELL et al., 2002), onde um RNA aberrante é reconhecido e convertido em dsRNA, que em seguida é processado pelas proteínas DCLs em pequenos RNAs de interferência (siRNAs), e esses siRNAs são carregados pelas proteínas argonautas, para guiar a degradação do RNA alvo (NAKAYASHIKI; KADOTANI; MAYAMA, 2006). O RISC normalmente silencia genes que possuem sequências que sejam complementares às sequências dos sRNAs, que no caso da interação planta-patógeno, podem ser genes de imunidade do hospedeiro (WANG; WEIBERG; JIN, 2015). Atualmente, os estudos e o uso do RNAi vêm sendo cada vez mais relevantes e promissores em se tratando do controle de doenças em plantas e isso se dá por ser uma estratégia considerada muito específica pois degrada um mRNA alvo (SPADA et al., 2021). Dentre elas, o silenciamento de genes induzido por spray (SIGS) tem ganhado destaque por utilizar pequenos RNAs de interferência aplicados de forma exógena na planta hospedeira, como nas folhas ou caules, para desencadear o silenciamento e controlar o crescimento do patógeno (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2022).

Os sRNAs normalmente são gerados por proteínas DCLs, que pertencem a família Ribonuclease III. Essas proteínas são encontradas em vários eucariotos e apresentam um papel importante no RNAi, onde sua principal função é descrita como o processamento de dsRNAs em fragmentos menores nas células vivas (CATALANOTTO et al., 2004). Essas enzimas são consideradas componentes essenciais na regulação gênica que envolvem pequenos RNAs e já foram descritas em vários organismos eucarióticos como conservadas, porém com diferenças no número de cópias de genes nos organismos distintos (KADOTANI et al., 2004; SCHAUER et al., 2002). Em *Arabidopsis thaliana* encontram-se quatro DCLs codificadas (PÉREZ-CAÑAMÁS et al., 2021), duas isoformas são descritas em *Drosophila* (SU et al., 2022), em animais vertebrados e no nematóide *Caenorhabditis elegans* são codificadas por um gene (VERGANI-JUNIOR et al., 2021), mas já em angiospermas foram descritas cinco DCLs (MARGIS et al., 2006).

Proteínas DCLs são importantes para a geração de sRNAs, e esses podem ter funções significativas na interação planta-patógeno. Em *Botrytis cinerea* foi visto que pequenos RNAs oriundos do processamento por DCLs são capazes de atuar como efetores, sequestrando a maquinaria de RNAi do hospedeiro, silenciando genes que estão envolvidos na imunidade da planta, e assim facilitando a sua colonização. Quando foi obtido o mutante com perda de função de *dcl1* e *dcl2* que não produz mais esses pequenos RNAs, *B. cinerea* teve sua patogenicidade afetada e a análise desses sRNAs como efetores auxiliou na identificação de genes de imunidade do hospedeiro (WANG et al., 2017; WEIBERG et al., 2013). Assim, é importante entender melhor o funcionamento dos pequenos RNAs que podem atuar como efetores em fungos fitopatogênicos, visto que esses sRNAs podem ser decisivos na especificidade do mecanismo de silenciamento gênico (TABARA et al., 2021). Em *Fusarium graminearum* foi demonstrado que mutantes com substituição de DCL tiveram sua virulência reduzida, indicando que a patogenicidade do fungo está relacionada com sRNAs processados por DCLs (WERNER et al., 2021). Em *Valsa mali*, causador do cancro nas macieiras, observou-se que sem as DCLs, houve alteração na patogenicidade do fungo, na geração dos sRNAs, além de diminuição nas respostas ao estresse por peróxido de hidrogênio e cloreto de potássio (FENG et al., 2017).

No gênero *Colletotrichum* também é possível observar os efeitos da ausência de DCLs. Em *C. gloesporioides* foram gerados mutantes com perda de função para *dcl1*, *dcl2* e para ambos. Foi observado que quando os dois genes são deletados, os

sintomas da doença são reduzidos, a conidiação e o crescimento vegetativo do fungo (WANG et al., 2018). Em *C. lindemuthianum* foram encontrados dois genes que codificam proteínas DCLs, *dcl1* e *dcl2*. O primeiro com 4.808 nucleotídeos codifica uma proteína de 1.535 aminoácidos e apresenta 4 íntrons. E o segundo com 4.563 nucleotídeos, codifica uma proteína de 1.452 aminoácidos e apresenta 4 íntrons. Essas proteínas têm quatro domínios principais: de ligação ao ATP/ helicase; helicase C-terminal; de ligação ao dsRNA e de atividade de ribonuclease III (NOGUEIRA et al., 2019).

O papel dos pequenos RNAs ainda não está definido em *C. lindemuthianum*. Como as proteínas DCLs são, provavelmente, as principais responsáveis pela geração desses pequenos RNAs, é importante avaliar os efeitos da ausência dessas proteínas no desenvolvimento, na conidiação, na formação de tubos germinativos e tubos de anastomose e na patogenicidade da espécie. O estudo genético e molecular de *C. lindemuthianum* é importante para entender melhor o patossistema e pensar em formas mais ativas de controle visto seu grande número de variantes virulentas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Localizado no Instituto de Biotecnologia aplicado à Agropecuária/BIOAGRO em Viçosa, Minas Gerais.

2.1 Microrganismo, condições de cultivo e hospedeiro utilizado

Os experimentos foram realizados com o fungo fitopatogênico *C. lindemuthianum*, linhagem A₂ 2-3, raça fisiológica 89, pertencente ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os fungos foram preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI; 1939) para uso em curto prazo, e pelo método de sílica-gel (PÉREZ-GARCÍA et al., 2006), para uso em longo prazo.

Colletotrichum lindemuthianum foi cultivado primeiramente no meio Ágar Batata Dextrose, BDA (glicose 20 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹; batata 200 g.L⁻¹), a 22 °C com fotoperíodo de 12 h por 10 dias. Os mutantes foram cultivados em meio BDA, foram inoculados em meio de cultura YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) também a 22 °C, fotoperíodo de 12 h e uma concentração de 1x10⁶ conídios foi inoculada em meio de cultura líquido 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) sob agitação de 150 rpm. Os mutantes obtidos foram cultivados em BDA acrescido 80 µg/mL de higromicina (Sigma), 250 µg/mL de geneticina (Roche) ou ambos. Para o ensaio de conidiação e anastomose de conídios, os isolados foram cultivados em meio YMC a 22°C, ou em vagens esterilizadas.

Para os testes de patogenicidade, o hospedeiro utilizado foi a cultivar Pérola de feijoeiro-comum, que é suscetível a antracnose (EMBRAPA, 2013).

2.2 Análise das sequências de aminoácidos codificadas pelos genes *dcl1* e *dcl2*

Para a análise filogenética de DCLs em *C. lindemuthianum*, foi feita a filogenia utilizando as sequências de aminoácidos que compõem DCL1 e DCL2 de várias espécies de fungos e essas sequências foram acessadas no GenBank (Apêndice A). Para o alinhamento das sequências de proteínas, foi utilizado o software MEGA 10.2 (NEWMAN; DUFFUS; LEE, 2016), utilizando a ferramenta ClustalW. Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o método de máxima verossimilhança (Likelihood) e valores de *bootstrap* com 1000 replicatas (NEWMAN; DUFFUS; LEE, 2016). Para a comparação entre os domínios foi utilizado o software *online* InterPro (BLUM et al., 2021).

2.3 Construção dos cassetes para a deleção dos genes *dcl1* e *dcl2*

Para a construção dos cassetes de deleção dos genes *dcl1* e *dcl2* de *C. lindemuthianum* foi utilizada a técnica de *Split Marker* (CATLETT et al., 2003). Essa técnica se baseia em fusões de amplicons utilizando reações de PCR em duas rodadas, seguida de recombinação *in vivo*. Na primeira rodada, aproximadamente 1 Kb das regiões flanqueadoras 5' e 3' não traduzidas (UTR) dos genes *dcl1* e *dcl2*, e o gene marcador foram amplificados. O volume final das reações foi ajustado para 50 µL dos quais 5 µL eram de tampão PFU buffer [10X]; 2 µL de cada oligonucleotídeo [5 µM]; 1 µL de dNTP [10 mM]; 0,5 µL de PFU polimerase [2,5 U/µL] e 2 µL de DNA [25 ng/µL]. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, de acordo com as recomendações do fabricante.

Na segunda rodada, as regiões flanqueadoras amplificadas foram fusionadas por PCR com os genes marcadores de seleção. Para que ocorra a fusão, as extensões do gene marcador e da região flanqueadora dos genes alvo devem ser complementares (Figura 1). A segunda reação de PCR diferiu da primeira reação apenas na quantidade de oligonucleotídeos utilizados (0,5 µL).

Os oligonucleotídeos foram desenhados com o programa disponível online *PRIMER3Plus* (UNTERGASSER et al., 2007), de acordo com a sequência de cada

gene acessada no GenBank: ALJ83740.1 para *dcl1* e ALJ83737.1 para *dcl2* (Tabela 1).

O cassete de deleção do gene *dcl1* foi construído utilizando o plasmídeo pSM1 (PÖGGLER et al., 2003) para amplificação do gene *hph* que confere resistência à higromicina, com os oligonucleotídeos universais M13R/NLC37 e M13F/NLC38. Para a extremidade 5' do gene *dcl1*, os oligonucleotídeos utilizados foram DCL-1 5'F e DCL-1 5'R e para a extremidade 3', foram utilizados os oligonucleotídeos DCL-1 3'F e DCL-1 3'R (Tabela 1).

Para a construção do cassete de deleção do gene *dcl2*, foi utilizado o plasmídeo pSilentDual (NGUYEN et al., 2008), que carrega o gene *nptII*, que confere resistência a geneticina (G-418). O gene *nptII* foi amplificado com os oligonucleotídeos nptII-5'F, nptII-5'R, nptII-3'F e nptII-3'R. Para a extremidade 5' do gene *dcl2*, os oligonucleotídeos DCL-2 5'F e DCL-2 5'R foram utilizados, e para a extremidade 3' foram utilizados DCL-2 3'F e DCL-2 3'R (Tabela 1). As condições de PCR utilizadas para a construção dos cassetes de deleção de ambos os genes foram 98°C: 30s; (98°C: 10 seg, 58°C: 30 seg, 72°C: 2 min) x 35 ciclos; 72°C: 2 min. Para a segunda rodada, a temperatura de anelamento foi aumentada para 60°C. As reações foram amplificadas utilizando o termociclador Bio-Rad C1000™.

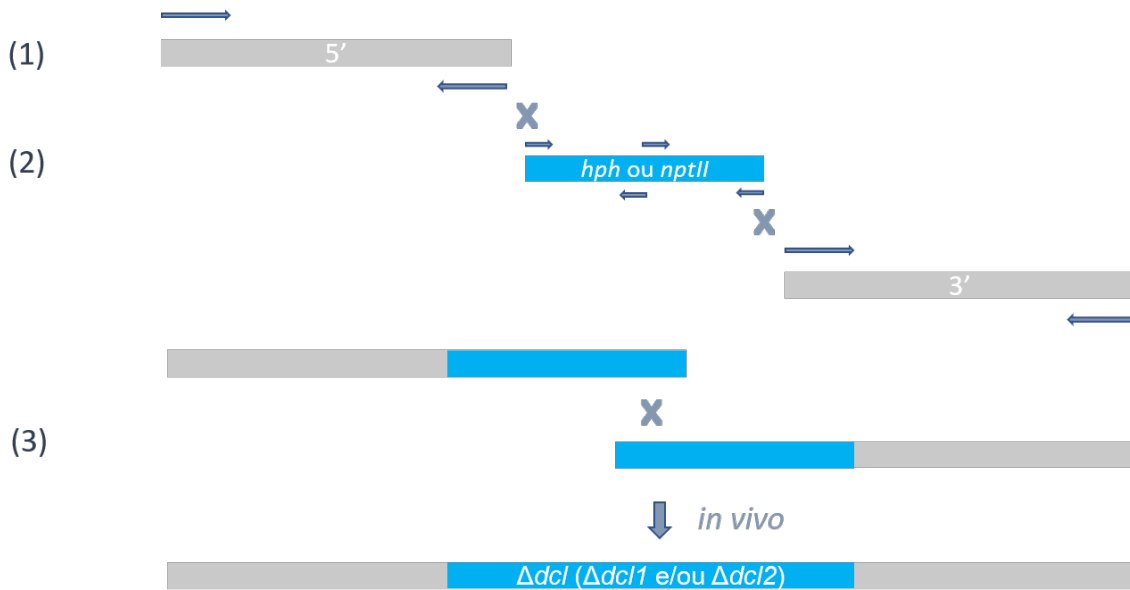


Figura 1. Esquema da técnica de *Split Marker* para a construção dos cassetes de deleção dos genes *dcl1* e *dcl2*. Em 1 é demonstrado a primeira rodada de PCR, os fragmentos flanqueadores das regiões UTR 5' e 3' e os genes marcadores de seleção (*hph* e *nptII*) são amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos descritos na tabela 1. Na segunda rodada de reações de PCR (2), os fragmentos amplificados anteriormente são funcionados formando os cassetes de deleção da região 5' e da região 3'. Os cassetes de deleção são utilizados na transformação e ocorre a recombinação *in vivo* (3). Setas horizontais indicam o local em que os oligonucleotídeos anelam. X: onde acontecem as fusões dos fragmentos. *hph*: Higromicina -B- fosfotransferase, que confere resistência à higromicina. *nptII*: Neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência à geneticina.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Finalidade
1. DCL-1 5' F 2. DCL-1 5' R	AAGTGGCTTACCTGCAGACG gtcgtgactgggaaaaccctggcgGTTTTGAGATGGGCGAGGTA	Construção do cassete de integração
3. DCL-1 3' F 4. DCL-1 3' R	tcctgtgtgaaattgttatccgctCTTGCAAATCAAGCGAACA GATCGAGCGCAGCTAACTCT	Construção do cassete de integração
5. DCL-2 5' F 6. DCL-2 5' R	tcagttaacgtcctcgagggTTTCTCCCAATGACCGTAGC TGTAGTGGTGTGGTCGGTGT	Construção do cassete de integração
7. DCL-2 3' F 8. DCL-2 3' R	atgaaaattccgtcaccagcGCGTCACGAAGTGATTGCTA TGTCAGCAAGACATTGAGG	Construção do cassete de integração
9. M13F 10. M13R	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Construção do cassete de integração
11. NLC37 12. NLC38	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	Construção do cassete de integração
13. nptII-5'F 14. nptII-5'R	CCCTCGAGGACGTAACTGA CCTGATGCTCTTCGTCCAG	Construção do cassete de integração
15. nptII-3'F 16. nptII-3'R	ACAATCGGCTGCTCTGATG GCTGGTGACGGAATTTTCAT	Construção do cassete de integração
17. DCL-1 5'F conf 18. DCL-1 3'R conf	GTTTGGGGTTGTCTTCTGA GGGTTTGCTCACCATCAACT	Confirmação de integração do cassete nas linhagens mutantes
19. DCL-2 5'F conf 20. DCL-2 3'R conf	TGTATTCCCGTACGTGCTGA AATCACAGCCCATTCTCGTC	Confirmação de integração do cassete nas linhagens mutantes

2.4 Transformação genética de *C. lindemuthianum*

Em 300 mL de meio GPYECH foram inoculados 1×10^6 conídios/mL e a cultura foi mantida sob agitação (150 rpm) a 22°C, durante 60 horas. Para a obtenção dos protoplastos, um grama de micélio seco obtido através da filtração do micélio crescido no meio líquido e em seguida foi seco utilizando papel absorvente, foi tratado com KCl 0,8 M em tampão fosfato 10 mM pH 5,8 e 12 mg/mL de *Lysing Enzyme* (Sigma Aldrich) e a mistura foi incubada a 30°C por 3 horas a 80 rpm. Os protoplastos obtidos foram filtrados em gaze estéril colocada em seringa e lavados 3 vezes por meio de centrifugação a 3000g, a 4°C. Para a primeira e a segunda lavagem, os protoplastos foram ressuspensos em 10 e em 5 mL de ST (Sorbitol 1 M; Tris HCl 0,01 M pH 7,5) respectivamente, e na última lavagem os protoplastos foram ressuspensos em 5 mL de STC (Sorbitol 1 M; Tris HCl 0,01 M pH 7,5 e CaCl₂ 0,05 M). Os protoplastos foram diluídos até uma concentração final de 10^7 protoplastos em 0,1 mL de STC.

Para a transformação, 10 µg dos cassetes de deleção foram adicionados a 200 µL da suspensão de protoplastos e 50 µL de uma solução de 60% de polietilenoglicol (PEG) 6000 50 mM CaCl₂, misturados e incubados no gelo por 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da mesma solução de PEG e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, os protoplastos foram inoculados usando o método *pour-plate*, em BDA contendo sacarose (0,56 M) (PEREIRA et al., 2004). Após 48h, uma nova camada de BDA foi adicionada (10 mL) contendo higromicina (80 µg/mL) ou geneticina (250 µg/mL).

Para a obtenção dos mutantes duplos, um mutante $\Delta dcl1$ foi utilizado para a preparação dos protoplastos e transformação com o cassete para a deleção do gene *dcl2*. Nesta etapa, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima para a obtenção dos mutantes simples. No entanto, foram adicionados os dois antimicrobianos (higromicina e geneticina) para a seleção dos transformantes.

2.5 Extração de DNA e confirmação dos mutantes por PCR

Após a obtenção dos transformantes, as linhagens resistentes foram analisadas por PCR com os oligonucleotídeos apresentados na tabela 1, para a detecção dos transformantes que apresentavam integração homóloga do cassete. Para isso, foi feita uma extração rápida de DNA, onde um disco de micélio dos transformantes foi macerado em 500 µL do tampão de extração (SDS 0,2%, EDTA 50 mM pH 8,0) e incubados a 65°C por meia hora. Em seguida, foi realizada uma centrifugação por 15 minutos a 15.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foram adicionados 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 1,5 volume de isopropanol. Foi feita uma nova centrifugação de 1 minuto a 15.000g e os *pellets* formados foram lavados com etanol 70% e ressuspensos em água MilliQ autoclavada. Para a análise dos transformantes foram realizadas PCRs utilizando oligonucleotídeos que anelam nas sequências dos genes marcadores e em sequências localizadas a direita e a esquerda dos genes deletados (Tabela 1). As condições da PCR foram as mesmas usadas anteriormente. Foi realizada a purificação monospórica dos transformantes que apresentaram as deleções.

2.6 Caracterização genética dos transformantes por *Southern blot*

O DNA total da linhagem selvagem (WT) e dos mutantes foi extraído (SPECHT et al., 1982) para averiguar o número e os tipos de integrações do cassete utilizado para deleção de *dcl1* e *dcl2* no genoma de *C. lindemuthianum*. O DNA total foi clivado com enzimas de restrição definidas de acordo com o padrão de restrição observado nos genes alvos (Figura 2). Para *dcl1* foi utilizada a enzima *BglII* e para *dcl2*, foi utilizada a enzima *ApaI*.

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel com concentração de 0,8% numa corrida *overnight* e foram transferidos para uma membrana de náilon utilizando um aparato de transferência (SOUTHERN; 1975). A sonda foi construída utilizando o kit PCR DIG Probe Syntesis (Roche Applied Science) usando os oligonucleotídeos da tabela 1 (3/4 para *dcl1* e 5/6 para *dcl2*) e a temperatura de hibridização foi calculada de acordo com o conteúdo GC das sondas. A hibridização e a detecção imunológica foram feitas utilizando o kit DIG DNA Labeling

and Detection (Roche Applied Science), de acordo com as recomendações do fabricante.

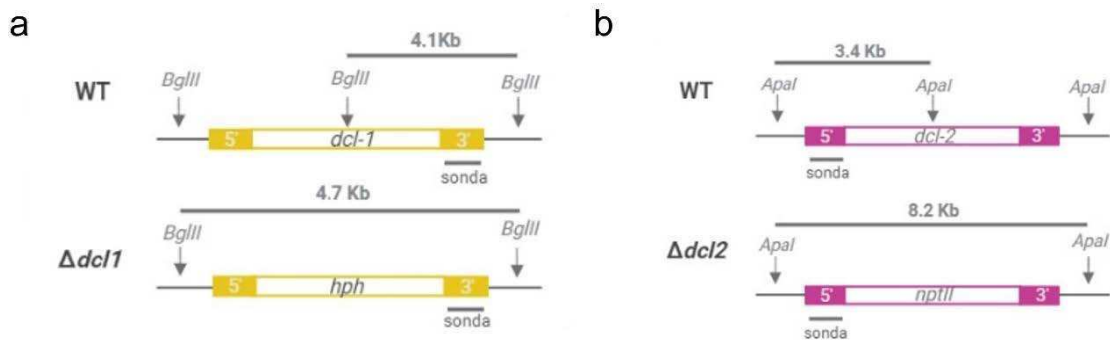


Figura 2. Sítios de clivagem localizados nos genes *dcl1* e *dcl2* e nas regiões 5' e 3' no genoma de *Colletotrichum lindemuthianum*. Para a clivagem de *dcl1*, foi utilizada a enzima de restrição *BglII* e a sonda foi a região flanqueadora 3'. No tipo selvagem, a clivagem produz um fragmento contendo 4100 pb e nos mutantes produz um fragmento de 4700 pb (a). Para a clivagem de *dcl2* foi utilizada a enzima de restrição *ApaI* e foi utilizada como sonda na região 5'. No tipo selvagem a clivagem produz um fragmento de 3400 pb e nos mutantes um fragmento de 8200 pb (b). WT: selvagem.

2.7 Análises fenotípicas

2.7.1 Ensaio de desenvolvimento e conidiação

As linhagens WT e mutantes foram cultivados em meio de cultura BDA por 5 dias e um disco da borda da cultura foi retirado e inoculado em outra placa contendo BDA. Os fungos foram incubados em BOD a 22°C, após 10 dias, o diâmetro da colônia foi medido e a taxa de crescimento micelial foi calculada.

Para o ensaio de conidiação, as linhagens WT e mutantes foram cultivadas em meio BDA por 5 dias, um disco de micélio da borda da colônia foi retirado e transferido para uma placa contendo meio YMC. As placas foram incubadas em BOD por 10 dias a 22°C, com fotoperíodo de 12h. Os conídios foram coletados e foi feita uma suspensão com água destilada para que fossem contados ao microscópio e quantificados (WANG et al., 2018).

Os experimentos foram feitos em 3 repetições com triplicatas cada e as taxas foram submetidas a análise ANOVA e teste de médias no software R (IHAKA; GENTLEMAN, 1996).

2.7.2 Anastomose de conídios

Para a análise da anastomose de conídios das linhagens mutantes em comparação com a WT, os isolados foram cultivados em BDA por 5 dias e posteriormente, discos de micélio das bordas das colônias foram tirados e inoculados em vagem autoclavadas duas vezes, e colocados em BOD por 16 dias, a 22°C com fotoperíodo de 12h. Em seguida, os conídios foram coletados e suspensos em água destilada. Aproximadamente 2 mL da suspensão de conídios na concentração 1×10^6 , preparada em água destilada autoclavada, foram colocadas placas de Petri pequenas e foram incubadas a 22°C no escuro e avaliadas após 72 horas. Os tubos de anastomose foram observados e quantificados utilizando microscópio invertido (ISHIKAWA et al., 2010).

Os experimentos foram feitos em 3 repetições com triplicatas cada e os valores foram submetidos a análise ANOVA e teste de médias no software R (IHAKA; GENTLEMAN, 1996).

2.7.3 Germinação de conídios

Para a análise da germinação de conídios, os isolados foram cultivados em meio YMC por 10 dias e posteriormente uma alíquota de 4 mL de uma suspensão de conídios (1×10^6 /mL) foram colocadas em placas de Petri pequenas e foram mantidas a 22°C com fotoperíodo de 12h. Após 48h, as placas foram analisadas em microscópio invertido, e os conídios com um ou mais tubos germinativos formados, sem apresentar formação de CATs, foram quantificados (ISHIKAWA et al., 2010).

Os experimentos foram feitos em 3 repetições com triplicatas cada e os valores foram submetidos a análise ANOVA e teste de médias no software R (IHAKA; GENTLEMAN, 1996).

2.8 Ensaio de patogenicidade

A linhagem selvagem e os mutantes foram avaliados quanto à patogenicidade em folhas primárias do feijoeiro-comum, cultivar Pérola, no estágio V3. As sementes foram semeadas em vasos de 500 mL contendo o substrato Topstrato® e foram utilizados 10 vasos para cada tratamento, em cada repetição, conduzidas em delineamento inteiramente casualizado. Para o teste com folhas destacadas, folhas foram retiradas e inoculadas nas superfícies abaxial e adaxial, por pulverização, com uma suspensão de 1×10^6 conídios/mL e foram incubadas em BOD a 22°C no escuro. Os sintomas foram avaliados por 6 dias.

Para o teste com a planta, foi borrifada uma suspensão de conídios (1×10^6 /mL) nas faces abaxial e adaxial das folhas com 10 dias de idade, que foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas no escuro, e em seguida transferidas para casa de vegetação. Os sintomas foram avaliados por 6 dias (DUFRESNE et al., 1998).

Para controle negativo em ambos os testes, foi utilizada água destilada autoclavada. Para controle positivo, foi utilizada a linhagem selvagem.

Para o teste preliminar com o possível mutante duplo, folhas primárias de feijoeiro-comum da cultivar Pérola com 10 dias de idade foram destacadas e pulverizadas com uma suspensão de conídios do isolado. As folhas, colocadas em placas de Petri, foram incubadas em BOD à 22°C no escuro. Os sintomas foram avaliados por 6 dias. Controles positivos e negativos foram os mesmos dos testes com os mutantes simples.

A agressividade do fitopatógeno foi quantificada utilizando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) onde foram analisadas as folhas escaneadas, e posteriormente, os valores foram submetidos à análise de variância e teste de média, no software R (IHAKA; GENTLEMAN, 1996). Para o possível mutante duplo, a análise foi qualitativa.

3. RESULTADOS

3.1 Análise *in silico* dos genes *dcl1* e *dcl2* de *C. lindemuthianum*

Os genes *dcl1* e *dcl2* são codificadores putativos das proteínas Dicer-like que fazem parte de um importante mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional em fungos. Para entender melhor a conservação dessas proteínas no fungo ascomiceto *C. lindemuthianum*, foi feito o alinhamento das duas sequências de nucleotídeos. Com o alinhamento dessas sequências, observou-se que elas possuem 44,8% de identidade. No entanto, quando foram alinhadas as sequências dos aminoácidos, a identidade encontrada foi de 22,5%. Em termos de tamanho, DCL1 possui 83 aminoácidos a mais que DCL2. Nogueira et al. (2019) descreveu que as duas proteínas DCLs de *C. lindemuthianum* possuem os mesmos domínios em posições equivalentes (Figura 3). Comparando os domínios das duas proteínas, em DCL2 encontra-se um domínio helicase DEAD/DEAH, que são helicases envolvidas no desenrolamento de ácidos nucleicos, além da ligação de ATP, esse domínio não é encontrado em DCL1. Por outro lado, DCL1 possui um domínio de Helicase/Uvr N-terminal, que além das ligações de DNA e ATP, possui atividade de hidrolase e não é encontrado em DCL2. Alinhando separadamente cada domínio semelhante das duas proteínas, observa-se que a porcentagem de identidade entre eles é relativamente pequena (Tabela 2).

Tabela 2. Identidade dos domínios similares de DCL1 e DCL2 de *C. lindemuthianum* e localização na sequência de aminoácidos.

Proteínas	Domínio	Região	Identidade
DCL1 DCL2	Ligação ATP helicase	109-326 60-266	28,9%
DCL1 DCL2	C-terminal da helicase	466-559 428-590	24,2%
DCL1 DCL2	Ligação a dsRNA	634-724 620-717	22,9%
DCL1 DCL2	Ribonuclease III	1277-1399 971-1138	22,7%
DCL1 DCL2	Ribonuclease III	1240-1422 1154-1359	24,4%

As sequências de DCL1 e DCL2 de diferentes espécies de *Colletotrichum* foram comparadas quanto à presença e a posição dos domínios conservados encontrados em *C. lindemuthianum* e ao número de aminoácidos (Figura 3). Na figura 3 percebe-se semelhança nas posições e que os quatro domínios estão presentes na maioria das espécies para ambos os genes, e que apenas *C. spaethianum* não possui o domínio de ligação ao ATP da helicase em DCL2, apresentando certa divergência com as demais. No geral, essas informações indicam que DCL1 e DCL2 são amplamente distribuídas no gênero *Colletotrichum*.

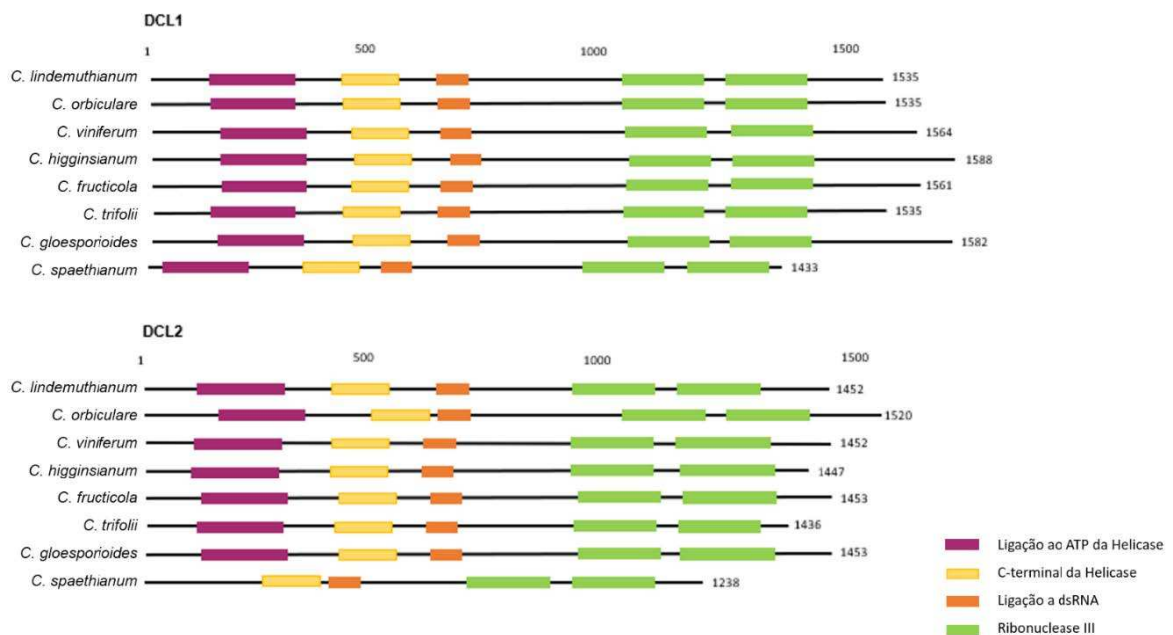


Figura 3. Domínios conservados em Dicer-like 1 (DCL1) e Dicer-like 2 (DCL2) de diferentes espécies de *Colletotrichum*.

3.2 Análise filogenética das proteínas codificadas pelos genes *dcl1* e *dcl2*

A análise filogenética foi feita com base nas sequências das proteínas DCL1 e DCL2 de várias espécies de fungos filamentosos. A árvore filogenética foi obtida por meio da análise de máxima verossimilhança, utilizando *bootstraps* com 1000 replicatas. Com ela foi possível perceber que essas proteínas são amplamente distribuídas nos fungos filamentosos.

No gênero *Colletotrichum*, pode ser observado que há distinções entre as sequências de aminoácidos, já que foram identificados ramos diferentes nos cladogramas. Apesar disso, as espécies do gênero se agrupam com bastante proximidade, indicando relação filogenética. Espécies de fungos que pertencem a uma mesma ordem, se agrupam no mesmo clado. Essas observações foram vistas em ambas as árvores (Figuras 4 e 5).

Colletotrichum lindemuthianum se agrupou no clado com *C. trifolii*, *C. spinosum*, *C. orbiculare* e *C. sidae*. Apesar de serem proteínas com sequências distintas, os resultados para DCL1 e DCL2 foram semelhantes.

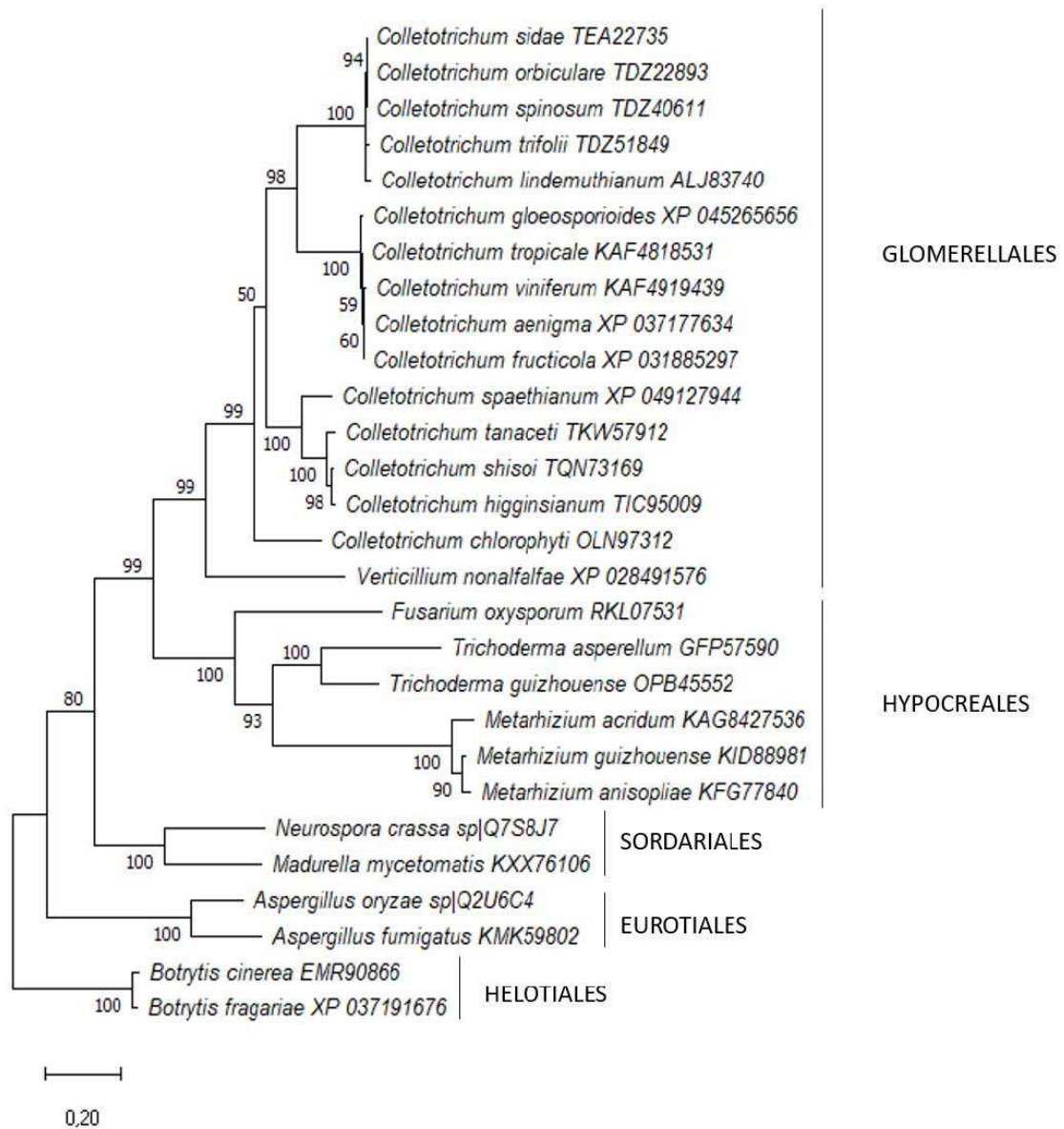


Figura 4. Filogenia da proteína DCL1 de *C. lindemuthianum* com as homólogas de outras espécies de fungos filamentosos. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e as sequências foram alinhadas no software Mega 10.2. *Bootstrap* com 1000 replicatas.

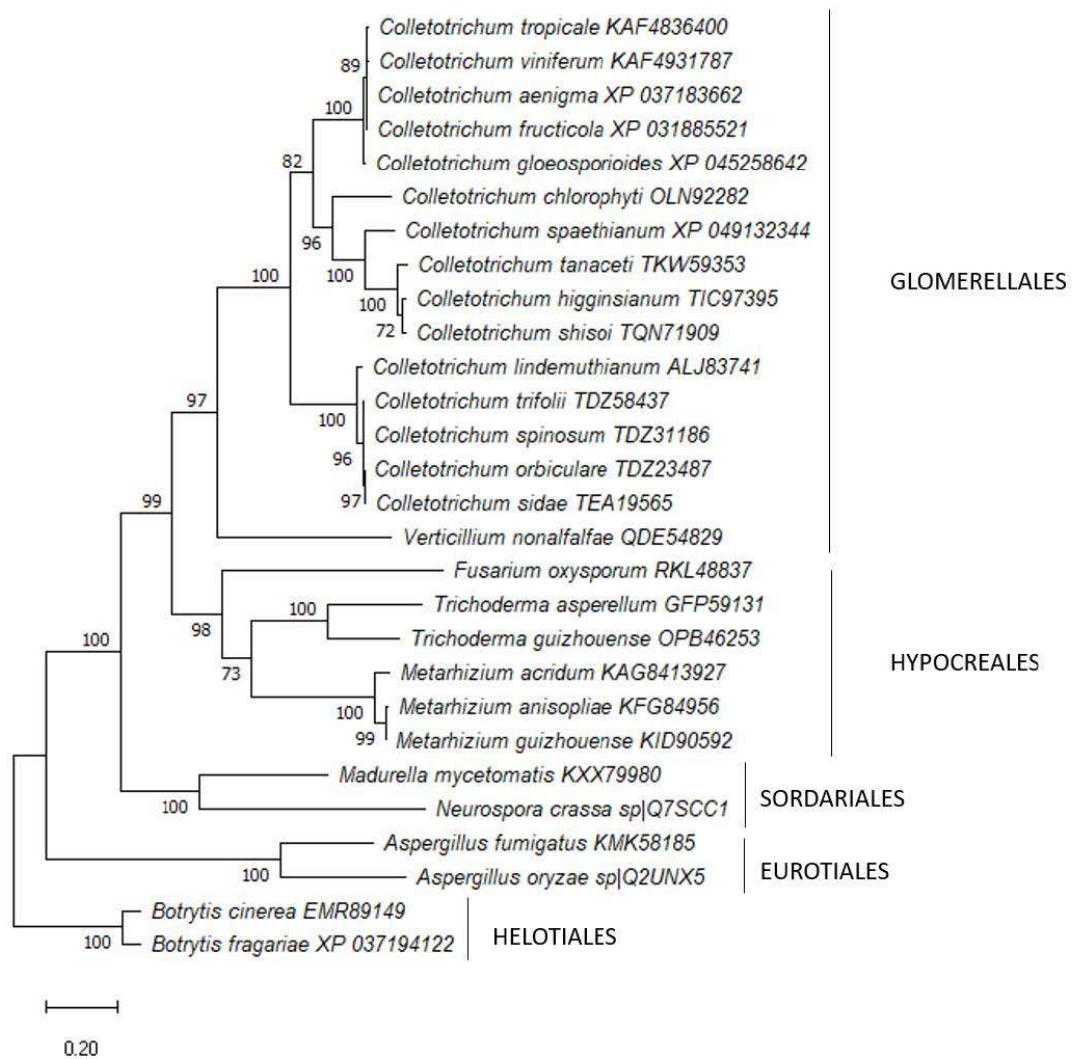


Figura 5. Filogenia da proteína DCL2 de *C. lindemuthianum* com as homólogas de outras espécies de fungos filamentosos. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança e as sequências foram alinhadas no software Mega 10.2. *Bootstrap* com 1000 replicatas.

3.3 Isolamento dos mutantes $\Delta dcl1$, $\Delta dcl2$ e $\Delta dcl1\Delta dcl2$

Como os pequenos RNAs podem ter participação importante na patogenicidade de *C. lindemuthianum* e como as proteínas DCL1 e DCL2 são provavelmente as principais responsáveis por seu processamento, os genes *dcl1* e *dcl2* foram deletados pela técnica de *Split Marker*, como mostrado na figura 1.

Após a transformação, foram isolados 39 transformantes para o gene *dcl1* e 52 transformantes para o gene *dcl2*. Os transformantes foram purificados por isolamento monospórico e analisados quanto à ocorrência de troca gênica, que levaria a deleção do gene selvagem, o mesmo ocorreu para o possível mutante duplo (Figura 6).

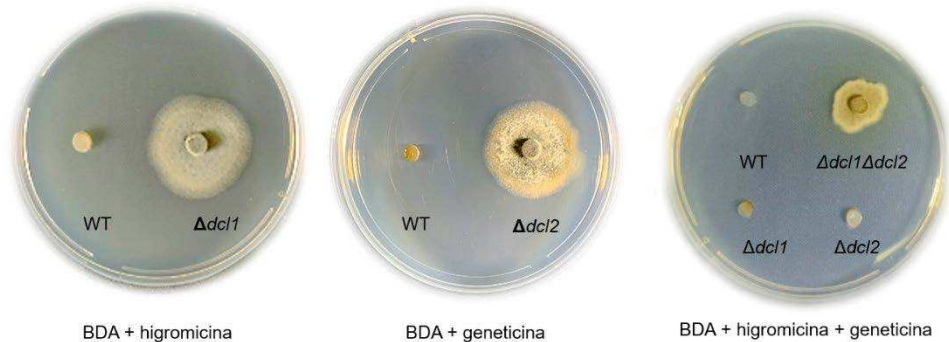


Figura 6. Crescimento de *C. lindemuthianum* tipo selvagem e dos mutantes ($\Delta dcl1$, $\Delta dcl2$ e $\Delta dcl1\Delta dcl2$) em meio BDA com o antibiótico (higromicina ou geneticina) usado para a seleção dos transformantes. Foram inoculados discos de micélio de aproximadamente 5 mm. WT: tipo selvagem.

Para a detecção dos mutantes com apenas uma integração do cassete entre os transformantes isolados, primeiramente foi realizada uma triagem para determinar quais eram aqueles que possuíam a deleção dos genes *dcl1* ou *dcl2*. Essa triagem é necessária uma vez que a maioria das integrações de DNA durante a transformação em fungos filamentosos é ectópica, ocorrendo fora do locus homólogo. Assim foi realizada a extração rápida de DNA de todos os transformantes para as reações de PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos localizados na região flangeadora do gene e dentro do gene de seleção escolhido. Para confirmar a deleção de *dcl1* ($\Delta dcl1$) foram usados os pares de oligonucleotídeos 17/12 ou 18/11, da tabela 1. Para confirmar a deleção de *dcl2* ($\Delta dcl2$), foram usados os pares de oligonucleotídeos 19/14 ou 20/15 (Tabela 1). Dos 39 transformantes obtidos para $\Delta dcl1$, 13 apresentaram a deleção de acordo com o resultado da PCR e para $\Delta dcl2$, dos 52 transformantes obtidos e analisados, 18 apresentaram a deleção. Em seguida, foi realizado o *Southern blot*, para confirmar a deleção dos genes e determinar quais transformantes apresentavam uma única integração do cassete (Figura 7).

Para a hibridização de transformantes para *dc/1*, foi utilizada como sonda a região 3' que flanqueia o gene, com 901 pb. Para o isolado selvagem era esperado um fragmento de 4,1 Kb e para os mutantes nos quais tivesse ocorrido a substituição era esperado uma banda única com 4,7 Kb (Figura 2a). Dos 13 transformantes, 5 (Tr38, Tr34, Tr31, Tr21 e Tr3) apresentaram a deleção e uma única integração do cassete (Figura 7b).

Para a hibridização dos transformantes para *dc/2* foi utilizada como sonda a região flanqueadora 5', com 922 pb. Para a linhagem selvagem era esperado um fragmento de 3,4 Kb e nos mutantes era esperado uma banda única com 8,2 Kb (Figura 2b). Entre os 18 transformantes analisados, 4 (Tr37, Tr34, Tr18 e Tr6) apresentaram a deleção e uma única integração do cassete (Figura 7d). Posteriormente, um mutante de cada gene foi selecionado aleatoriamente para a realização dos testes.

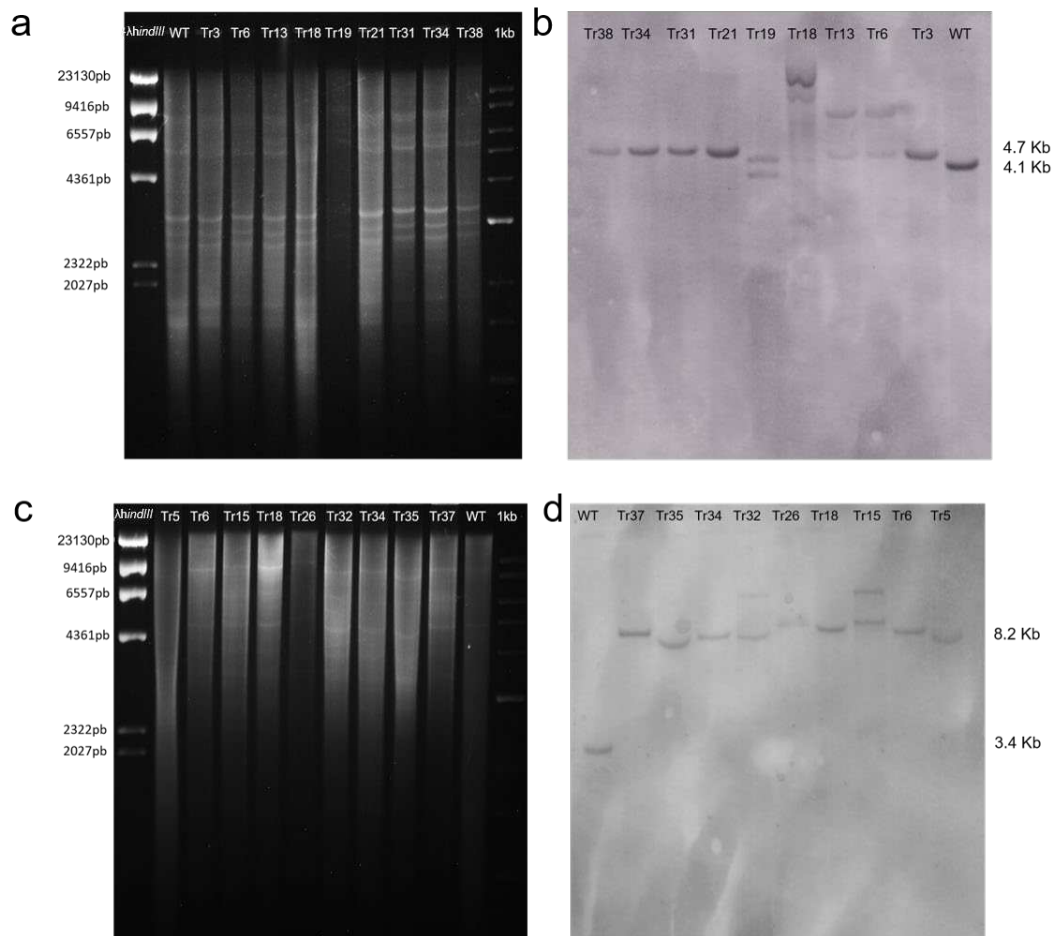


Figura 7. Caracterização molecular dos transformantes de *C. lindemuthianum* por meio de *Southern blot*. DNA total dos candidatos a mutantes $\Delta dcl1$ (Tr3, Tr6, Tr13, Tr18, Tr19, Tr21, Tr31, Tr34 e Tr38) e do tipo selvagem (WT) clivado com a enzima de restrição *Bgl*III e separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (a). Perfil de hibridização com a sonda de 901 pb (b). DNA total dos candidatos a mutantes $\Delta dcl2$ (Tr5, Tr6, Tr15, Tr18, Tr26, Tr32, Tr34, Tr35 e Tr37) clivado com a enzima de restrição *Apa*I e separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (c). Perfil de hibridização com a sonda de 922 pb (d). Marcadores: Lambda *Hind*III e 1Kb.

Para a obtenção do mutante duplo, um mutante simples $\Delta dcl1$ foi transformado com o cassete que possuía o gene de resistência à geneticina, construído para substituir *dcl2*. Foram obtidos 15 transformantes selecionados no meio BDA contendo higromicina e geneticina. Foi feita a PCR de confirmação para esses isolados, utilizando um oligonucleotídeo de fora do gene e outro de dentro do marcador de seleção. Os oligonucleotídeos usados foram os mesmos para a confirmação de $\Delta dcl2$,

descritos acima, e foi obtido um mutante duplo (Tr2). Na PCR foi observado um amplicon de 2,5Kb, correspondente a região flanqueadora 5' mais parte do gene marcador (Figura 8). Como controles positivos da reação, foram utilizados DNAs de mutantes com deleção de *dcl2*, e como controle negativo, DNA do tipo selvagem (Figura 8).

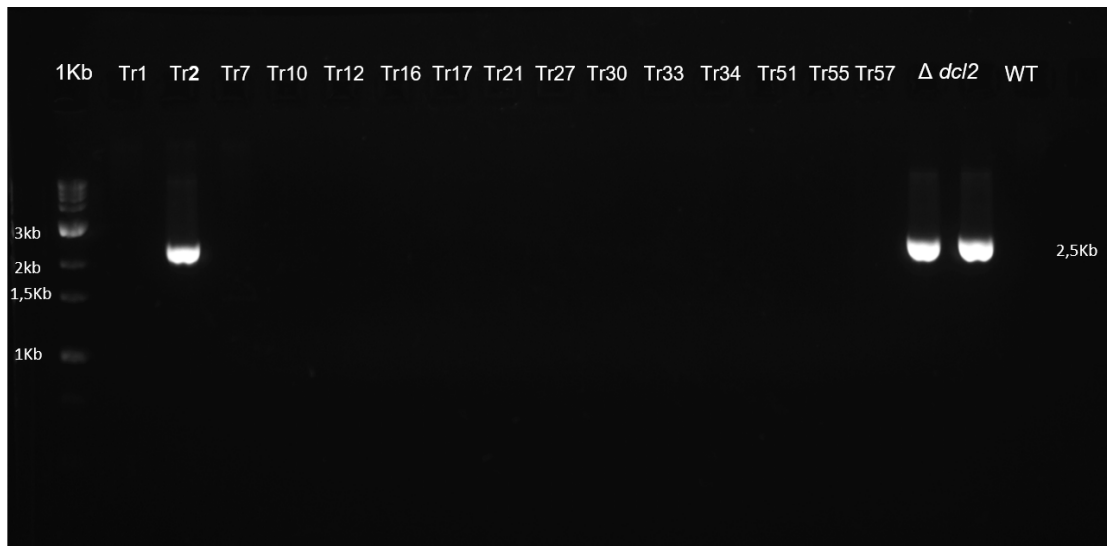


Figura 8. Amplicons resultantes da PCR de confirmação da deleção dupla dos genes *dcl1* e *dcl2* em *C. lindemuthianum*. Amplificação da região 5' que flanqueia *dcl2* e de uma parte do gene *nptII*, que confere resistência a geneticina. Os fragmentos quando somados possuem tamanho de 2500 pb. 1 Kb: Marcador. Tr: Transformantes selecionados pela adição de higromicina e geneticina no meio de cultura. $\Delta dcl2$: Controles positivos. WT: Controle negativo da reação de PCR.

Tabela 3. Caracterização dos transformantes obtidos.

Gene	Nº de transformantes	Nº de transformantes confirmados por PCR	Nº de mutantes obtidos
<i>dcl1</i>	39	13	4
<i>dcl2</i>	52	18	5
ambos	15	1	1*

(*) a ser confirmado por *Southern blot*

3.4 Papel das proteínas Dicer-like no crescimento e conidiação de *C. lindemuthianum*

Foi analisado o crescimento dos mutantes $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ em comparação com o tipo selvagem, em um meio de cultura rico (BDA) e em um meio de cultura com déficit nutricional (YMC), onde o crescimento de $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ não diferiu do tipo selvagem (Figura 9a). Também foi analisado a capacidade de conidiação dos mutantes em comparação com o tipo selvagem, onde a produção de conídios de $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ foi semelhante à do tipo selvagem (Figura 9b).

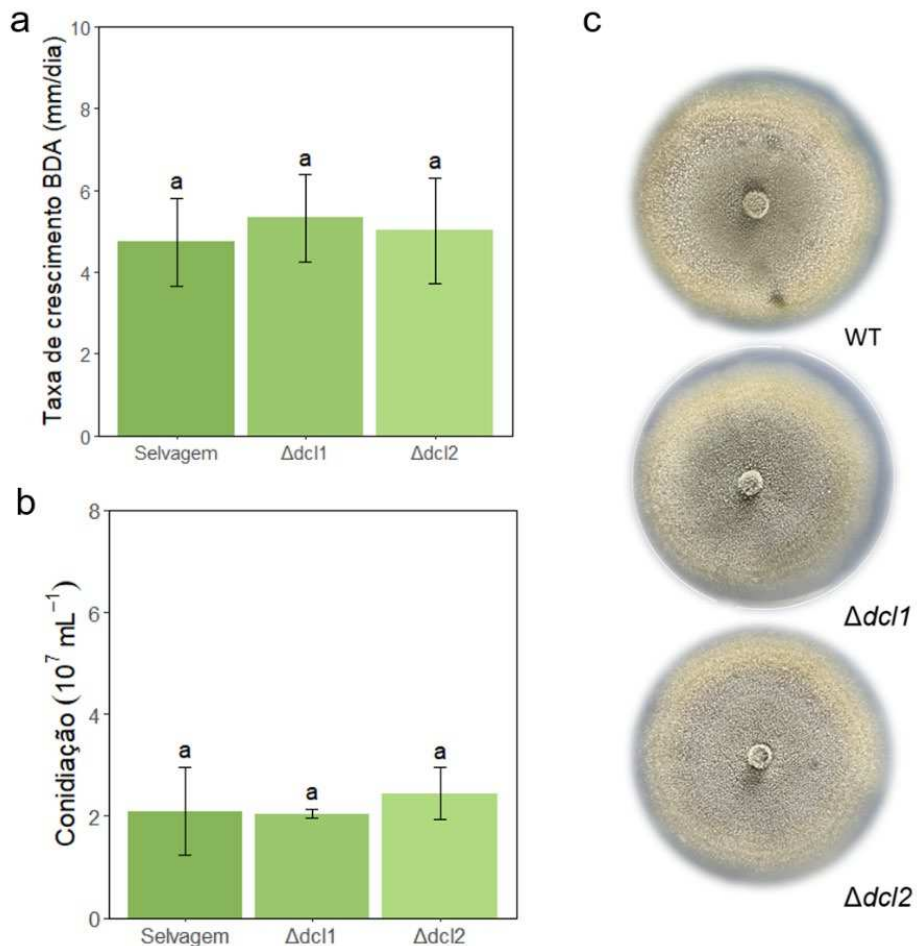


Figura 9. Análises fenotípicas dos mutantes simples com deleção dos genes *dcl* em *C. lindemuthianum*. Taxa de crescimento micelial em meio BDA (a). Taxa de conidiação (b). Morfologia do crescimento micelial em meio BDA (c). Todas as análises foram submetidas a ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. Barras de erro representam o desvio padrão e colunas com letras distintas demonstram diferença significativa.

3.5 Avaliação dos tubos de anastomose de conídios (CATs) nos mutantes $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ de *C. lindemuthianum*

A formação de CATs de conídios foi analisada comparando os mutantes simples $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ com o tipo selvagem. Em todos os isolados foi possível identificar a presença dos CATs (Figura 10). No entanto, a porcentagem de formação dos CATs foi diminuída nos mutantes simples quando comparado com o tipo selvagem (Figura 11a).



Figura 10. Anastomose de conídios (CATs) em isolados de *C. lindemuthianum*. Setas pretas indicam fusão entre conídios por tubos de anastomose. Seta branca mostra tubo germinativo. Selvagem (a). Mutante $\Delta dcl1$ (b). Mutante $\Delta dcl2$ (c). Fotos tiradas em microscopia óptica de placas contendo suspensão de conídios (10^6) em água destilada autoclavada após 72 horas de incubação.

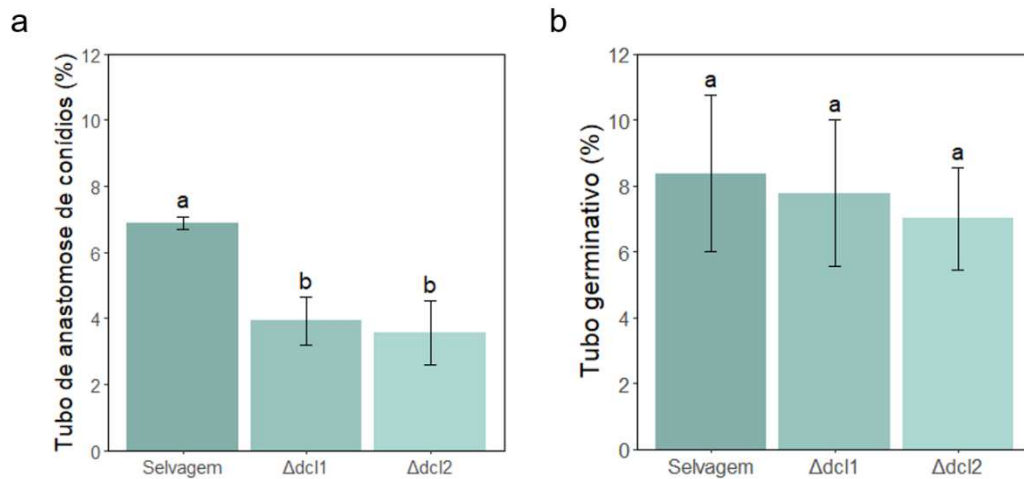


Figura 11. Porcentagem de formação de tubos de anastomose de conídios (a) e de tubos germinativos (b) de *C. lindemuthianum* tipo selvagem em comparação com os mutantes simples $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$. Todas as análises foram submetidas a ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. Barras de erro representam o desvio padrão e colunas com letras distintas demonstram diferença significativa.

3.6 Papel das proteínas Dicer-like na germinação de conídios em *C. lindemuthianum*

A germinação de conídios de *C. lindemuthianum* foi analisada também com a comparação do tipo selvagem com os mutantes simples. A figura 11b mostra que não houve diferença significativa na porcentagem de germinação de conídios entre a linhagem selvagem e os mutantes simples.

3.7 Papel das proteínas Dicer-like na patogenicidade de *C. lindemuthianum*

O tipo selvagem de *C. lindemuthianum* e os mutantes $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ foram inoculados em plantas de feijoeiro-comum, da cultivar Pérola que é suscetível à antracnose, para analisar se haveria diferença no desenvolvimento da doença. Em todos os tratamentos, a partir do quarto dia de inoculação foi possível observar os primeiros sintomas nas nervuras das folhas. No sexto dia de inoculação, os sintomas foram avaliados (Figura 12). As plantas e folhas destacadas inoculadas com os mutantes com deleção simples ($\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$) apresentaram sintomas semelhantes e não houve diferença significativa quando comparadas com as plantas e folhas

destacadas inoculadas com a linhagem selvagem (Figura 13). A deleção de um dos genes que codifica DCLs não influencia na patogenicidade de *C. lindemuthianum*.

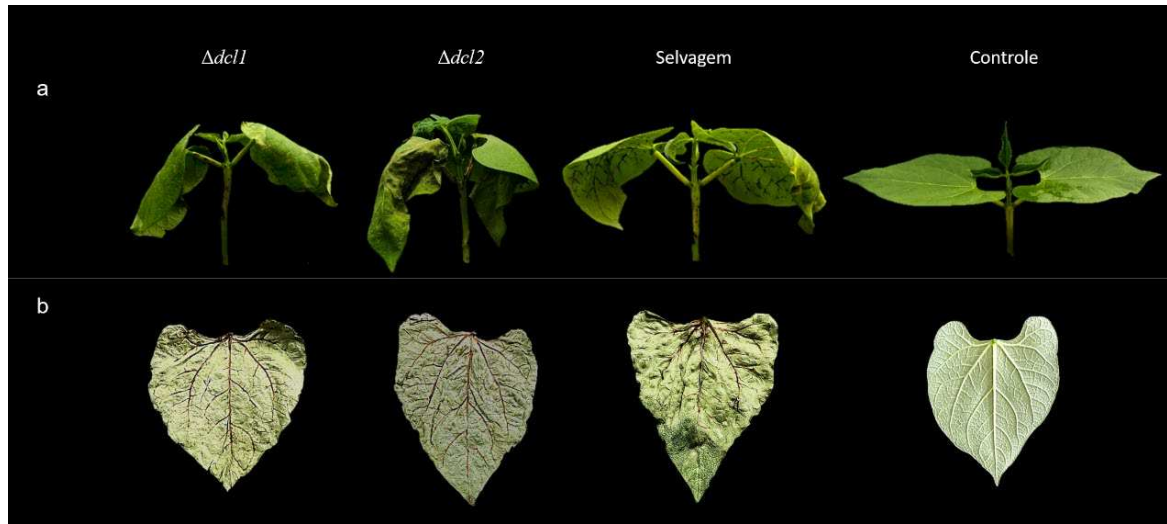


Figura 12. Avaliação da patogenicidade do tipo selvagem e dos mutantes simples $\Delta dcl1$ e $\Delta dcl2$ de *C. lindemuthianum*. Plantas em estágio V3 que foram inoculadas com suspensão de conídios na concentração $10^6/\text{mL}$ por meio de pulverização e condicionadas em câmara de nevoeiro por 6 dias (a). Folhas cotiledonares destacadas de plantas no estágio V3 e condicionadas em BOD à 22°C por 6 dias (b).

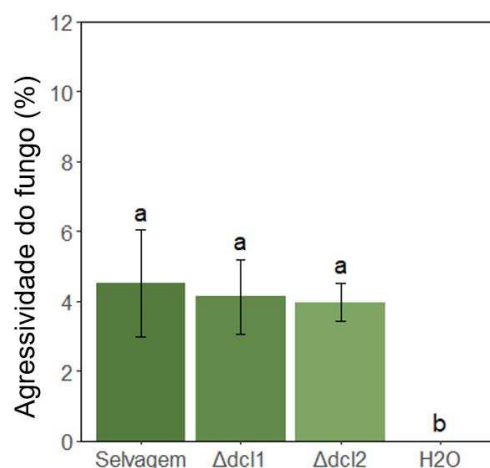


Figura 13. Gráfico da agressividade de *C. lindemuthianum* nas plantas de feijoeiro-comum. Todas as análises foram submetidas a ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. Barras de erro representam o desvio padrão e colunas com letras distintas demonstram diferença significativa.

Após a deleção dos dois genes, e a confirmação do mutante duplo por PCR, foi feito um teste de patogenicidade preliminar com folhas destacadas do feijoeiro-comum. No quarto dia de teste após a inoculação, começaram a aparecer sintomas nas folhas inoculadas com o tipo selvagem e nenhum sintoma nas folhas pulverizadas com a suspensão de conídios do mutante duplo e com água estéril. Nos dias posteriores, foram percebidos poucos sintomas no possível duplo mutante, ao contrário das folhas inoculadas com o isolado selvagem, onde os sintomas da antracnose já dominavam os tecidos (Figura 14). A priori, essa observação sugere que a perda dos dois genes que codificam proteínas DCLs tem como consequência a diminuição da agressividade do patógeno.

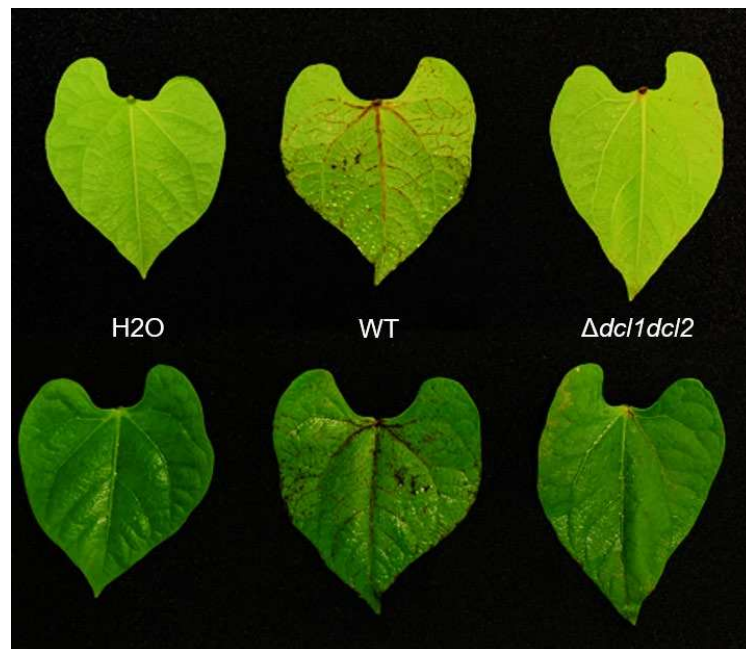


Figura 14. Folhas destacadas de feijoeiro-comum pulverizadas com água destilada autoclavada (H₂O); com o fungo da linhagem selvagem (WT); com o possível mutante duplo para os genes que codificam DCLs ($\Delta dcl1\Delta dcl2$). As fotos foram tiradas 6 dias após a inoculação.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a análise das proteínas DCL1 e DCL2 de *C. lindemuthianum* e o isolamento e avaliação dos mutantes $\Delta dcl1$, $\Delta dcl2$ e $\Delta dcl1\Delta dcl2$ visando a compreensão do papel dessas proteínas no desenvolvimento e na patogenicidade de *C. lindemuthianum*.

Ao alinhar a sequência de aminoácidos da proteína DCL1 de *C. lindemuthianum* com as sequências de proteínas DCL1 de diferentes fungos, é possível observar uma maior similaridade com a proteína DCL1 de *C. orbiculare*, *C. spinosum* e *C. trifolii*. Fazendo a mesma coisa com a sequência de aminoácidos de DCL2, observa-se maior similaridade com as mesmas proteínas das mesmas espécies do gênero. Isso não é uma surpresa, já que todas essas espécies pertencem ao complexo *Orbiculare*. Os resultados mostram que os genes das proteínas DCL são distribuídos no gênero, e se for analisado em fungos filamentosos no geral, também podem ser considerados amplamente distribuídos, já que há grande similaridade também com proteínas DCL de fungos de outros gêneros como *Verticillium* e *Metarhizium*. Na análise filogenética das sequências de ambas as proteínas isso é confirmado quando fungos pertencentes ao mesmo gênero e ordem se encontram no mesmo clado. Esse resultado mostra como as proteínas DCLs devem ser importantes para os fungos analisados, onde são encontrados fungos com diferentes modos de vida, mostrando que esse gene está presente no genoma dos fungos desde antes da especiação.

Os pequenos RNAs desempenham várias funções nas células e são reguladores de muitos processos, incluindo o silenciamento gênico durante a interação hospedeiro-patógeno (ISLAM et al., 2018; OUYANG et al., 2014; ROSE; OVERDIJK; VAN DAMME, 2019). Levando em consideração que as proteínas DCLs são responsáveis pela produção de sRNAs e visando a compreensão da atuação dos sRNAs em *C. lindemuthianum*, foi realizada a obtenção de mutantes $\Delta dcl1$, $\Delta dcl2$ e $\Delta dcl1\Delta dcl2$ para analisar o comportamento do fungo na ausência das respectivas proteínas. Com a análise dos mutantes simples quanto ao desenvolvimento, não houve diferenças nas taxas de crescimento micelial quando foram comparados com o tipo selvagem. Ao contrário do que aparentemente acontece com o mutante duplo, que apresenta crescimento mais lento. Essas observações estão de acordo com o

que já foi visto em outra espécie do gênero (*C. gloesporioides*), em que mutantes simples não diferiram no crescimento em relação ao tipo selvagem, apenas o mutante duplo apresentou modificação no fenótipo (WANG et al., 2018).

Quanto à conidiação, o mutante $\Delta dcl2$, quando inoculado em vagem estéril, produz mais conídios que o tipo selvagem. Os conídios de *C. lindemuthianum* possuem uma mucilagem ao seu redor que tem uma coloração salmão, as vagens inoculadas com $\Delta dcl2$ visualmente tinham mais pontos de cor salmão do que as vagens inoculadas com o tipo selvagem, apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre os isolados. No entanto, o mutante duplo putativo não apresentou a coloração salmão típica quando cultivado em meio de cultura para conidiação (YMC), demonstrando que a formação de conídios possivelmente não ocorreu. Isso se refletiu na obtenção da concentração ideal de conídios para inoculação em folhas, onde foram necessárias mais placas e/ou vagens do que foi necessário nos experimentos com os mutantes simples para obtenção da concentração ideal da suspensão de conídios. Essas informações indicam que a deleção dupla é capaz de prejudicar a produção de conídios de *C. lindemuthianum*. Resultado semelhante foi visto em *C. gloesporioides*, onde a conidiação foi aumentada em $\Delta dcl1$, um dos mutantes simples obtidos e tanto ela como o crescimento foram drasticamente reduzidos no mutante duplo (WANG et al., 2018).

A variabilidade genética observada em *C. lindemuthianum* pode ser o resultado da troca de material genético que ocorre por meio dos CATs. O isolado da raça fisiológica 89, utilizado neste trabalho, é capaz de formar os CATs, que também foram formados nos mutantes simples, apesar de terem ocorrido em uma porcentagem menor. Esses tubos de anastomose estão relacionados com a transferência de citoplasma, organelas e até mesmo núcleos de um conídio para o outro (ISHIKAWA et al., 2012; ROCA et al., 2004) e essa transferência pode facilitar a colonização em ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes, já que conídios com CATs podem germinar mais rápido (ROCA et al., 2005; ROCA et al., 2003). A relação de proteínas DCLs e a formação de CATs não é esclarecida. No entanto, a redução da formação de CATs em isolados que possuem perda de função de *dcl1* ou *dcl2* mostra que os sRNA podem ter um papel importante na formação dos CATs. Quanto à formação de tubos germinativos, não houve diferença significativa entre o tipo selvagem e os

mutantes simples, indicando que a germinação dos conídios não tem relação com proteínas DCL em *C. lindemuthianum*.

Os estudos de Weiberg *et al.* (2013), com *B. cinerea*, que demonstraram que sRNAs podem atuar como efetores, foram importantes para entender melhor a interação de fitopatógenos com as plantas e relacionar os sRNAs processados por proteínas DCL com a virulência do fungo, como visto em *Fusarium graminearum* (WERNER *et al.*, 2021), *C. gloesporioides* (WANG *et al.*, 2018), *Valsa mali* (FENG *et al.*, 2017), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (MUETH; RAMACHANDRAN; HULBERT, 2015), dentre outros. Para averiguar essa relação em *C. lindemuthianum*, foi feita a análise da agressividade do fungo no feijoeiro-comum. Não houve diferença significativa dos sintomas do hospedeiro infectado pelo tipo selvagem e pelos mutantes simples. Isso indica que a deleção de apenas um dos dois genes que codificam DCLs também não é suficiente para alterações na patogenicidade de *C. lindemuthianum*, o que pode sugerir redundância funcional entre os dois genes, onde a deleção de um deles foi suprida pelo outro. Isso era esperado visto que, em *C. gloesporioides*, apenas a deleção dupla dos genes que codificam DCLs foi capaz de afetar a patogenicidade (WANG *et al.*, 2018). No entanto, para confirmar essa hipótese são necessárias análises do mutante com deleção de ambos os genes. No teste preliminar com o possível mutante duplo foi observado que os sintomas da antracnose diminuíram nas folhas inoculadas com o mutante, sugerindo que a deleção de *dcl1* e *dcl2* interfere na agressividade de *C. lindemuthianum*. Com isso, pode-se deduzir que as proteínas DCLs têm papel importante na agressividade de *C. lindemuthianum*. Visto sua importância, pode-se pensar que com a deleção das DCLs houve comprometimento no processamento de pequenos RNAs que atuam por exemplo como efetores, ou na regulação da expressão de genes que codificam efetores, auxiliando na infecção do hospedeiro. Já foi visto tanto em *C. lindemuthianum* como em diferentes espécies que a deleção de genes que codificam importantes proteínas, como as transportadoras, pode interferir na sua virulência (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Neste trabalho foi demonstrado que as proteínas DCLs podem apresentar redundância funcional em *C. lindemuthianum* e isto já foi observado em diferentes espécies. Em *Neurospora crassa*, apenas quando os dois genes que codificam DCLs são deletados ocorrem defeitos no processamento de RNAs em pequenos RNAs

(CATALANOTTO et al., 2004). Em *C. gloesporioides*, os mutantes simples para os genes *dcl1* e *dcl2*, tiveram expressões semelhantes ao tipo selvagem, já a deleção dupla de *dcl1* e *dcl2*, fez com que ocorresse diminuição nas taxas de crescimento, conidiação e patogenicidade do fungo (WANG et al., 2018). É importante avaliar todos os genes que codificam essas proteínas porque em algumas espécies a redundância funcional de DCL não é encontrada. Nesses casos, um dos dois genes é o responsável pelo processamento de dsRNAs na via de silenciamento. *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone no arroz, possui dois genes que codificam proteínas DCLs, no entanto foi observado que apenas o gene *dcl2* é capaz de produzir pequenos RNAs de interferência que estão relacionados com a via de silenciamento de RNA, e dessa forma, as duas proteínas de *M. oryzae* tem funções diferentes na regulação gênica (COUCH; KOHN, 2017; KADOTANI et al., 2004). No fungo micoparasita *Clonostachys rosea*, a deleção de *dcl2* foi suficiente para resultar em um mutante com produção diminuída de metabólitos secundários, diminuiu também o antagonismo do fungo com o patógeno *B. cinerea* e reduziu também a capacidade de *C. rosea* controlar a podridão do trigo, causada por *Fusarium graminearum* (PIOMBO et al., 2021). Essa diversidade mostra a importância do estudo e compreensão das DCLs e, conseqüentemente, dos sRNAs em fungos filamentosos.

O RNAi e os pequenos RNAs atualmente vêm sendo muito estudados visto sua importância no desenvolvimento, na patogenicidade e na defesa contra ácidos nucleicos exógenos. Fungos fitopatogênicos podem usufruir dessa maquinaria para facilitar a sua colonização na planta, e a planta hospedeira também pode utilizar dessas ferramentas para se defender. Já foi visto que eles estão relacionados também com a comunicação entre reinos, como em *Botrytis cinerea*, o que pode ser interessante em se tratando de SIGS, por exemplo (WANG et al., 2016). Pensando nisso, o estudo do silenciamento gênico mediado pelo mecanismo de RNAi, dos pequenos RNAs e das enzimas DCLs tem um enorme potencial no controle de doenças fúngicas visando à proteção das plantas contra as infecções. Como foi demonstrada a importância das proteínas DCLs que compõem o RNAi em *C. lindemuthianum*, esse mecanismo pode vir a ser futuramente utilizado no controle da antracnose.

5. CONCLUSÕES

- As proteínas DCL1 e DCL2 estão presentes em fungos filamentosos de diferentes modos de vida;
- A ausência da proteína DCL1 ou da proteína DCL2 não afeta significativamente o crescimento, a conidiação, a formação de tubos germinativos e a patogenicidade de *C. lindemuthianum*;
- A formação de CATs é diminuída com a deleção de *dcl1* ou de *dcl2*;
- A deleção dupla de *dcl1* e *dcl2* possivelmente diminui a taxa de conidiação e a agressividade de *C. lindemuthianum*;
- Os genes *dcl1* e *dcl2* de *C. lindemuthianum* possuem redundância funcional.

6. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-DIAZ, J. C. et al. Genome-Wide Transcriptomic Analysis of the Effects of Infection with the Hemibiotrophic Fungus *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 1995, 1 ago. 2022.
- BICALHO NOGUEIRA, G. et al. The histidine kinase sInCl1 of *Colletotrichum lindemuthianum* as a pathogenicity factor against *Phaseolus vulgaris* L. **Microbiological Research**, v. 219, n. May 2018, p. 110–122, 2019.
- BLUM, M. et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D344–D354, 8 jan. 2021.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55–128, maio 2003.
- CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes e Development**, v. 16, n. 21, p. 2733–2742, 2002.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225–226, 1939.
- CATALANOTTO, C. et al. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 6, p. 2536–2545, 15 mar. 2004.
- CATLETT, N. et al. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 50, p. 9–11, 2003.
- COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 19, p. 10233–10238, 16 set. 1997.
- CONAB. **Conab - Boletim da Safra de Grãos**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- COUCH, B. C.; KOHN, L. M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 683–693, 2017.
- 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.
- DA SILVA, L. L. et al. Pectinolytic arsenal of *Colletotrichum lindemuthianum* and other fungi with different lifestyles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1857–1871, 1 set. 2022.
- DODDS, P.; RATHJEN, J. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010.

DUFRESNE, M. et al. *clk1*, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 2, p. 99–108, 1998.

ELLIS, J. et al. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 399–405, 2009.

EMBRAPA. Catálogo de cultivares de feijão comum. 2013.

FAOSTAT. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 15 nov. 2022.

FENG, H. et al. Dicer-like genes are required for H₂O₂ and KCl stress responses, pathogenicity and small RNA generation in *Valsa mali*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1166, 23 jun. 2017.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. **Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress**, v. 1, p. 151–181, 1 jan. 2013.

GILLARD, C.; RANATUNGA, N. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Crop Protection**, v. 45, p. 22–28, 2013.

HOGENHOUT, S. A. et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Am Phytopath Society**, v. 22, n. 2, p. 115–122, 2009.

HORBACH, R. et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 51–62, 2011.

HUANG, C. Y. et al. Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 2, p. 173–182, 14 ago. 2019.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R. A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, n. 3, p. 299–314, 1996.

ISHIKAWA, F. H. et al. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 1, p. 2–9, 2010.

ISHIKAWA, F. H. et al. Heterokaryon Incompatibility Is Suppressed Following Conidial Anastomosis Tube Fusion in a Fungal Plant Pathogen. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31175, 2 fev. 2012.

ISLAM, W. et al. Plant Responses to Pathogen Attack: Small RNAs in Focus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 515, 8 fev. 2018.

JIA, B. et al. Quantitative Trait Locus Mapping of Marsh Spot Disease Resistance in Cranberry Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7639, 1 jul. 2022.

JONES, J.; DANG, J. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JONGE, R. DE et al. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 400–406, 2011.

- KADOTANI, N. et al. One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44467–44474, 2004.
- LI, S. et al. MicroRNAs Inhibit the Translation of Target mRNAs on the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 562–574, 25 abr. 2013.
- MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, n. 10, p. 2442–2450, 2006.
- MEHTA, N.; BAGHELA, A. Quorum sensing-mediated inter-specific conidial anastomosis tube fusion between *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. siamense*. **IMA Fungus**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2021.
- MEHTA, N.; PATIL, R.; BAGHELA, A. Differential Physiological Prerequisites and Gene Expression Profiles of Conidial Anastomosis Tube and Germ Tube Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 509, 25 jun. 2021.
- MEZIADI, C. et al. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, v. 242, p. 351–357, 2016.
- MUETH, N. A.; RAMACHANDRAN, S. R.; HULBERT, S. H. Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 21 set. 2015.
- NABI, A. et al. Optimizing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation conditions in *Colletotrichum lindemuthianum*: a step forward to unravel the functions of pathogenicity arsenals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 293–307, 1 ago. 2022.
- NAKAYASHIKI, H.; KADOTANI, N.; MAYAMA, S. Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 1, p. 127–135, jul. 2006.
- NAY, M. M. et al. A Review of Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean. **Crop Science**, v. 59, n. 4, p. 1376–1391, 1 jul. 2019.
- NEWMAN, L.; DUFFUS, A. L.; LEE, C. Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data. **The American Biology Teacher**, v. 8, n. 7, p. 608–612, 2016.
- NGUYEN, Q. B. et al. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1348–1365, 1 jun. 2008.
- NICOLAS, F. E.; GARRE, V. RNA interference in fungi: Retention and loss. **The Fungal Kingdom**, p. 657–671, 5 set. 2016.
- NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 11, p. 2187–2198, 1 nov. 2022.

- O'CONNELL, R.; BAILEY, J.; RICHMOND, D. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75–98, 1985.
- OLIVEIRA, M. C. et al. The AbcCl1 transporter of *Colletotrichum lindemuthianum* acts as a virulence factor involved in fungal detoxification during common bean (*Phaseolus vulgaris*) infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1121–1132, 12 jul. 2022.
- OUYANG, S. et al. MicroRNAs Suppress NB Domain Genes in Tomato That Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004464, 1 out. 2014.
- PADDER, B. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, p. 317–330, 2017.
- PEREIRA, J. F. et al. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 891–900, nov. 2004.
- PÉREZ-CAÑAMÁS, M. et al. Genetic evidence for the involvement of Dicer-like 2 and 4 as well as Argonaute 2 in the *Nicotiana benthamiana* response against *Pelargonium line pattern virus*. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, p. 001656, 8 out. 2021.
- PEREZ-GARCIA PÉREZ-GARCÍA, A. A. et al. Long-term Preservation of *Podosphaera fusca* Using Silica Gel. **Wiley Online Library**, v. 154, n. 3, p. 190–192, mar. 2006.
- PINTO, J. M. A. et al. Investigating Phenotypic Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. **Am Phytopath Society**, v. 102, n. 5, p. 490–497, 11 abr. 2012.
- PIOMBO, E. et al. Role of Dicer-Dependent RNA Interference in Regulating Mycoparasitic Interactions. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, 2021.
- PÖGGLER, S. et al. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. **Current Genetics**, v. 43, n. 1, p. 54–61, 1 abr. 2003.
- PRUITT, R. N.; GUST, A. A.; NÜRNBERGER, T. Plant immunity unified. **Nature Plants**, v. 7, n. 4, p. 382–383, 30 mar. 2021.
- PUNIA, S. et al. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) starch: A review. **Legume Science**, v. 2, n. 3, p. e52, 1 set. 2020.
- REHMAN, Z.; SALARIYA, A.; ZAFAR, S. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 351–355, 2001.
- REINPRECHT, Y. et al. Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1172, 6 ago. 2020.
- ROCA, M GABRIELA; LEIA, NICK D; WHEALS, A. E. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. **FEMS microbiology**, v. 249, n. 2, p. 191–198, 2005.

- ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 40, n. 2, p. 138–145, 1 nov. 2003.
- ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycological Research**, v. 108, n. 11, p. 1320–1326, 2004.
- ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992.
- ROSE, L. E.; OVERDIJK, E. J. R.; VAN DAMME, M. Small RNA molecules and their role in plant disease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 115–128, 15 jan. 2019.
- SCHAUER, S. E. et al. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 11, p. 487–491, 1 nov. 2002.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SHAHI, S. et al. Nuclear dynamics and genetic rearrangement in heterokaryotic colonies of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 91, p. 20–31, 1 jun. 2016.
- SHARMA, P. 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.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, 1 nov. 2010.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 3, p. 503–517, 1975.
- SPADA, M. et al. Silencing of the Slit2-Type MAP Kinase Bmp3 in *Botrytis cinerea* by Application of Exogenous dsRNA Affects Fungal Growth and Virulence on *Lactuca sativa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, p. 5362, 19 maio 2021.
- SPECHT, C. et al. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158–163, 1982.
- SU, S. et al. Structural insights into dsRNA processing by *Drosophila* Dicer-2–Loqs-PD. **Nature**, v. 607, n. 7918, p. 399–406, 29 jun. 2022.
- TABARA, M. et al. Biochemical characterization of the dicing activity of Dicer-like 2 in the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 146, p. 103488, 1 jan. 2021.
- TARIQJAVEED, M. et al. Versatile effectors of phytopathogenic fungi target host immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 11, p. 1856–1873, 1 nov. 2021.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W71–W74, 2007.

- VERGANI-JUNIOR, C. A. et al. DICER: structure, function, and regulation. **Biophysical Reviews**, v. 13, n. 6, p. 1081–1090, 1 dez. 2021.
- WANG, M. et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, v. 2, n. 10, 19 set. 2016.
- WANG, M. et al. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. **RNA Biology**, v. 14, n. 4, p. 421–428, 3 abr. 2017.
- WANG, M.; WEIBERG, A.; JIN, H. Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 3, p. 219, 1 abr. 2015.
- WANG, Q. et al. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–12, 2018.
- WEIBERG, A. et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 2013.
- WERNER, B. T. et al. *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0252365, 1 ago. 2021.
- YUAN, M. et al. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102030, 1 ago. 2021.
- ZHOU, Q. et al. MicroRNA-like RNA Functions Are Required for the Biosynthesis of Active Compounds in the Medicinal Fungus *Sanghuangporus vaninii*. **Microbiology Spectrum**, p. e00219-22, 27 out. 2022.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Número de acesso ao GenBank das sequências de aminoácidos utilizadas para a análise filogenética de DCL1 e DCL2.

Proteínas	Espécie	Acesso GenBank
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	ALJ83740.1 ALJ83741.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum tropicale</i>	KAF4818531.1 KAF4836400.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum tanacetii</i>	TKW57912.1 TKW59353.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum spinosum</i>	TDZ40611.1 TDZ31186.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	XP_045265656.1 XP_045258642.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum sidae</i>	TEA22735.1 TEA19565.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum trifolii</i>	TDZ51849.1 TDZ58437.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	TDZ22893.1 TDZ23487.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum chlorophyti</i>	OLN97312.1 OLN92282.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum aenigma</i>	XP_037177634.1 XP_037183662.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum spaethianum</i>	XP_049127944.1 XP_049132344.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum viniferum</i>	KAF4919439.1 KAF4931787.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum shisoi</i>	TQN73169.1 TQN71909.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	TIC95009.1 TIC97395.1
DCL1 DCL2	<i>Colletotrichum fructicola</i>	XP_031885297.1 XP_031885521.1
DCL1 DCL2	<i>Verticillium nonalfalfae</i>	XP_028491576.1 QDE54829.1

DCL1 DCL2	<i>Botrytis cinerea</i>	EMR90866.1 EMR89149.1
DCL1 DCL2	<i>Botrytis fragariae</i>	XP_037191676.1 XP_037194122.1
DCL1 DCL2	<i>Neurospora crassa</i>	sp Q7S8J7.1 sp Q7SCC1.4
DCL1 DCL2	<i>Aspergillus oryzae</i>	sp Q2U6C4.2 sp Q2UNX5.1
DCL1 DCL2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KMK59802.1 KMK58185.1
DCL1 DCL2	<i>Trichoderma asperellum</i>	GFP57590.1 GFP59131.1
DCL1 DCL2	<i>Trichoderma guizhouense</i>	OPB45552.1 OPB46253.1
DCL1 DCL2	<i>Metarhizium guizhouense</i>	KID88981.1 KID90592.1
DCL1 DCL2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KFG77840.1 KFG84956.1
DCL1 DCL2	<i>Metarhizium acridum</i>	KAG8427536.1 KAG8413927.1
DCL1 DCL2	<i>Fusarium oxysporum</i>	RKL07531.1 RKL48837.1
DCL1 DCL2	<i>Madurella mycetomatis</i>	KXX76106.1 KXX79980.1