

LEANDRO VIEIRA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO GENE QUE
CODIFICA A HISTIDINA QUINASE *slnC11* E SUA
RELAÇÃO COM A PATOGENICIDADE,
OSMORREGULAÇÃO E RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS 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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

LEANDRO VIEIRA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO GENE QUE
CODIFICA A HISTIDINA QUINASE *slnC11* E SUA
RELAÇÃO COM A PATOGENICIDADE,
OSMORREGULAÇÃO E RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS 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: 01 de outubro de 2009

Prof^ª Elza Fernandes de Araújo
(Coorientadora)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Coorientador)

Prof^ª Denise Mara Soares Bazzolli

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof^ª Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

*Aos meus pais, Antônio e Amália,
A minha irmã Daniela,
Que me ensinaram a superar com alegria todos os momentos difíceis e agradecer
por tudo que tenho conseguido. Agradeço pelo imenso carinho e amor recebidos
durante a minha vida. A vocês, que mesmo estando tão longe, sempre estiveram
presentes na minha vida todos os dias.*

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença em minha vida, sempre me abençoando e guiando todas as minhas decisões. Agradeço todos os momentos e conquistas na minha vida.

Aos meus pais, Antônio e Amália, que, com amor, carinho e apoio constantes, tornaram possível minha formação.

À minha irmã, Daniela, pelo eterno companheirismo e amizade. Saudades sempre da sua companhia.

À minha sobrinha e afilhada linda, Gabriela, por trazer de novo a felicidade e o sorriso no rosto de todos da família.

Ao meu cunhado Roberto, pela amizade e apoio em todos esses anos de convívio.

As minhas tias Neide e Sueli, por todo carinho e pelo interesse constante em meus estudos e minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela excelente oportunidade de formação acadêmica.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos e pelos eternos momentos vividos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro imprescindível à realização deste trabalho.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela orientação segura e sempre presente, me incentivando nos momentos em que eu precisava, e pelo exemplo de profissionalismo.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelo carinho, pela preocupação e atenção prestadas em momentos que eu precisei, e pelo exemplo de vida, dedicação e profissionalismo.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pelos ensinamentos durante as disciplinas, pela co-orientação e pelas conversas sempre tão agradáveis ao longo desses anos de convívio.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pelo companheirismo no laboratório e pelos conselhos durante a condução dos experimentos.

Ao Prof^o Olinto Liparini Pereira, por aceitar com prontidão o meu convite e pela contribuição científica durante a defesa.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia por todo o apoio oferecido, pelos serviços prestados e pela amizade.

A todos os amigos queridos da BIO 2003, pelo bom convívio, pelo apoio e pelo companheirismo durante esses seis anos e meio. Em especial aos que me acompanharam de perto nesse mestrado, Nívea e Cecelo.

À minha amiga Janaína, pelo companheirismo, apoio, conselhos, carinho e preocupação nesses seis anos e meio de amizade.

A minha namorada Thamy, pelo amor e pela cumplicidade que construímos juntos e que tornam mais felizes os meus dias.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos que me acompanharam desde 2004: Viviane, Ximena, Rodrigo BQI e careca, Mariana, Kledna, Mayka, João, Jildete, Gilvan, Juliana, Michelle, Junio, Maycon, Daniel, Ana Karina, Darlene, Tatiana, Swiany, Marina, Juline, Ana Paula, Irene, Mariana Fontenelle, Guilherme, Janaína, Rafael, Leonardo, Emilene, Mateus, Ana Angélica, Andréia, Leandro Tchola, Mariane, Fábio, Carol, Jackeline, Rafariola, Tiago, Monalessa. Obrigado pelos bons momentos, pelas confidências, pelas boas conversas e pelo convívio em todos esses anos de laboratório.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia, Micorriza, Petróleo, Café Microbiologia de Alimentos e Industrial.

Aos amigos e familiares de São Paulo, dos quais sempre me lembro com saudades.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional, os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Leandro Vieira dos Santos, filho de Antônio dos Santos Filho e Maria Amália Vieira dos Santos, nasceu no dia 04 de março de 1982 na cidade de São Paulo, SP.

Em março de 2003, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em bacharel com ênfase em genética e biologia molecular em agosto de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em outubro de 2009.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>): origem, aspectos sociais e econômicos.....	3
2.2. <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> : agente causal da antracnose do feijoeiro comum...	5
2.3. O sistema de dois componentes em fungos.....	9
2.4. Produção de melanina em <i>Colletotrichum</i> e sua associação com o processo de infecção.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	18
3.2. Triagem do gene de patogenicidade a partir do banco genômico de <i>C. lindemuthianum</i>	18
3.3. Extração de DNA dos fagos recombinantes e hibridização.....	19
3.4. Clonagem do gene de patogenicidade isolado.....	19
3.5. Obtenção da sequência completa do gene <i>slnCII</i>	20
3.6. Análise filogenética do gene <i>slnCII</i>	21
3.7. Inativação do gene <i>slnCII</i>	22
3.8. Caracterização molecular do transformante.....	23
3.9. Teste de patogenicidade.....	24
3.10. Determinação da osmosensibilidade e resistência a fungicidas no mutante <i>slnCII</i> ..	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Identificação, isolamento e clonagem do gene <i>slnCII</i>	25
4.2. Sequenciamento e caracterização do gene <i>slnCII</i>	27
4.3. Inativação do gene <i>slnCII</i>	32
4.4. Caracterização fenotípica do mutante.....	36
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS	48
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	61

RESUMO

SANTOS, Leandro Vieira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2009. **Caracterização estrutural do gene que codifica a histidina quinase *slnC11* e sua relação com a patogenicidade, osmorregulação e resistência a fungicidas em *Colletotrichum lindemuthianum*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Maurício Dutra Costa.

O fungo filamentosso *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Briosi & Cav., agente causal da antracnose, é um importante patógeno do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Esse fungo é um excelente modelo de estudo para o entendimento do processo de infecção de fungos fitopatogênicos. Por meio de mutagênese por inserção de plasmídeo foi obtido um mutante (LVSa1) não patogênico de *C. lindemuthianum* com deficiência parcial na produção de melanina. O objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar o gene interrompido no mutante LVSa1 e comprovar a sua importância no processo de infecção da planta. O gene mutado foi isolado de um banco genômico de *C. lindemuthianum* e denominado *slnC11*. A análise da sequência revelou que *slnC11* codifica uma histidina quinase. A sequência apresenta uma ORF de 3555 pares de bases, interrompida por três íntrons putativos, contendo 51, 87 e 89 pb. O alinhamento múltiplo da sequência deduzida da proteína, com sequências de todas as classes de histidinas quinases disponíveis nos bancos de dados agrupou SlnC11 na classe VI, possuindo regiões extremamente conservadas características de histidina quinases e relacionadas a sua função. Por meio de mutagênese insercional sítio dirigida utilizando um fragmento do gene, foi obtido um mutante que apresentou deficiência parcial na produção de melanina. Esse mutante apresentou uma redução significativa na capacidade de infectar folhas de feijoeiro, demonstrando que SlnC11 é importante no processo de patogenicidade desse fungo. Como muitas histidinas quinases já descritas em fungos, SlnC11 apresenta envolvimento no processo de osmorregulação e adaptação a diferentes concentrações osmóticas em *C. lindemuthianum*. Além disso, por meio dessa proteína sensora, o fungo pode distinguir o estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares e de sais. O mutante mostrou-se sensível a fungicidas que tem como alvo uma via de sinalização MAPK, provavelmente regulada por *slnC11*. Os resultados obtidos sugerem que *C. lindemuthianum* deve possuir outras histidinas quinases envolvidas no processo de osmorregulação. O estudo da cascata de sinalização regulada por *slnC11* pode representar um grande avanço no entendimento do processo de patogenicidade e na elaboração de novos métodos de combate a doença.

ABSTRACT

SANTOS, Leandro Vieira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2009. **Structural characterization of the gene *slnCII* coding for a histidine kinase and its relation to pathogenicity, osmoregulation and fungicide resistance in *Colletotrichum lindemuthianum*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo e Maurício Dutra Costa.

The filamentous fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Briosi & Cav., causal agent of anthracnose, is an important pathogen of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). This fungus is an excellent model organism for understanding the infection process of pathogenic fungi. A *C. lindemuthianum* non-pathogenic mutant (LVSa1) with partial deficiency in the production of melanin was obtained through plasmid insertional mutagenesis. The aim of this study was to isolate and characterize the interrupted gene in the LVSa1 mutant and demonstrate its importance in the plant infection process. The mutated gene was isolated from a *C. lindemuthianum* genomic bank and named *slnCII*. The sequence analysis revealed that *slnCII* encodes a histidine kinase. The sequence presents an ORF of 3555 base pairs, interrupted by three putative introns, containing 51, 87 and 89 bp. The multiple alignment of the deduced sequence of the protein, including sequences of all histidine kinases classes available in the databases, grouped SlnCII in class VI; possessing highly conserved regions characteristic of histidine kinase, and related to its function. A mutant with partial deficiency for the production of melanin was obtained through site-directed insertional mutagenesis using a gene fragment. This mutant showed a significant reduction in the ability to infect bean leaves, demonstrating that SlnCII is important to the pathogenicity process of this fungus. As many histidines kinases already described in fungi, SlnCII is involved in osmoregulation and adaptation to different osmotic concentrations in *C. lindemuthianum*. Furthermore, through this sensor protein, the fungus can distinguish the osmotic stress caused by high concentrations of sugars and salts. The mutant was sensitive to fungicides that target a MAPK signaling pathway, probably regulated by *slnCII*. The results suggest that *C. lindemuthianum* must have other histidines kinases involved in the osmoregulation process. The study of the signaling cascade regulated by *slnCII* may represent a major advance in understanding the pathogenicity and developing new methods to combat this disease.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de dois componentes é um sofisticado sistema de detecção e monitoramento que permite aos microrganismos se adaptarem e sobreviverem a mudanças nas condições do meio em que se encontram, já tendo sido identificado em eubactéria, archaea e em alguns eucariotos. Esse sistema é composto por uma proteína histidina quinase, a qual possui um domínio de reconhecimento de sinal que se autofosforila sob um dado estímulo, uma unidade de fosfotransferência e duas proteínas reguladoras de resposta, sendo uma delas responsável por transmitir o estímulo ao alvo específico. Esse sistema de fosfotransferência é responsável por regular a resposta ao estresse osmótico por meio da cascata de sinalização HOG MAPK (High Osmolarity Glycerol - mitogen-activated protein kinase). Essa é uma das principais vias de transdução de sinal capaz de perceber o estresse osmótico e gerar uma resposta transcricional para a adaptação das células. Por esse sistema de fosfotransferência não ter sido identificado em animais e estar envolvido em importantes processos em microrganismos, essa via se tornou um atrativo alvo para agentes antimicrobianos. Em fungos filamentosos, essa via de transdução de sinais está envolvida com resposta a estresse osmótico e resistência a fungicidas em duas classes de histidina quinases: grupo III e grupo VI. Seu papel no processo de infecção em fungos fitopatogênicos ainda não foi completamente desvendado, porém muitos trabalhos relacionam a perda parcial ou total de patogenicidade em microrganismos que sofreram mutação de genes dessa via.

O fungo filamentoso *Colletotrichum lindemuthianum* é o agente etiológico da antracnose do feijoeiro comum. Ele afeta plantas do feijoeiro comum em todos os estágios do desenvolvimento, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes, causando grandes perdas, principalmente em locais de temperatura amena, alta umidade relativa e chuvas. Entre as medidas de controle dessa doença se destacam o emprego de cultivares de feijoeiro resistentes a antracnose. Entretanto, essa estratégia é limitada devido a grande variabilidade genética desse fungo. Assim sendo, existe a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de combate e controle dessa doença. Técnicas de mutagênese insercional, que empregam plasmídeos ou transposons, vêm sendo empregadas com sucesso na identificação de genes relacionados a patogenicidade em fungos fitopatogênicos. Usando-se a técnica REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição) e o plasmídeo pSM1, foi isolado um mutante de *C. lindemuthianum*, que

apresentou deficiência parcial na produção de melanina. Tal substância está fortemente ligada ao processo de infecção de diversos fungos fitopatogênicos. Esse mutante não foi capaz de infectar folhas de feijoeiro de um cultivar susceptível a antracnose, relacionado o produto desse gene na patogenicidade de *C. lindemuthianum*. Assim sendo, o plasmídeo utilizado na transformação foi recuperado, juntamente com as regiões que o flanqueiam e que correspondem ao putativo gene de patogenicidade. Esse trabalho relata sua identificação como o gene que codifica a histidina quinase Sln1, seu isolamento e a caracterização estrutural e funcional desse gene em *C. lindemuthianum*, mostrando a importância do seu produto na patogenicidade, osmorregulação e resistência a fungicidas nesse fungo.

2. Revisão de literatura

2.1. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*): origem, aspectos sociais e econômicos

O feijão está entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. Existem diversas hipóteses para explicar a origem e domesticação do feijoeiro. Algumas evidências suportam que o centro de origem da planta e sua domesticação como cultura teriam ocorrido na região da Mesoamérica, por volta de 7000 anos a.C., e disseminado, posteriormente, na América do Sul. Por outro lado, achados arqueológicos mais antigos (cerca de 10.000 a.C.) de feijões domesticados na América do Sul (sítio de Guitarrero, no Peru) são indícios de que o feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte (Embrapa arroz e feijão, 2009).

O feijão é um alimento básico para muitas pessoas, em especial na América Latina e África Central. No Brasil chega a ser um componente essencial na dieta diária da população. É um produto que se destaca pela sua importância econômica e pela qualidade nutricional, pois é uma grande fonte de proteínas com alto conteúdo de lisina, ferro, minerais, amido e fibras (Leterme & Munoz, 2002; Montoya et al., 2008; Wang et al., 2009).

Acredita-se que o efeito benéfico do consumo do feijão, em quantidades que variam de média a alta, é devido à presença de metabólitos secundários nessa leguminosa, os fitoquímicos, estando presentes em maiores concentrações os compostos fenólicos e os flavonóides. O consumo de fitoquímicos em feijões, particularmente de compostos fenólicos, está associado com a redução do risco de diabetes, obesidade, doença cardíaca coronariana, câncer de cólon e desordens gastrointestinais (Luthria & Pastor-Corrales, 2006; Xu & Chang, 2007; Ross et al., 2009; Siddiq et al., 2009; Jeng et al., 2009). Ademais, ocorre uma interessante complementação protéica quando o feijão é combinado com cereais, especialmente o arroz, proporcionando, em conjunto, os oito aminoácidos essenciais ao nosso organismo. Além do seu conteúdo protéico, o elevado teor de fibra alimentar, com seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, aliado às vitaminas, especialmente do complexo B, e aos carboidratos,

tornam o seu consumo altamente vantajoso como alimento funcional, representando importante fonte de nutrientes e de energia.

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus*. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies englobados como feijão nas estatísticas da FAO, este envolve cerca de 107 países produtores em todo o mundo. Os maiores produtores mundiais do feijão comum são Brasil, China, Índia, México e EUA (Fernández-Luqueño et al., 2009). Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México e o primeiro na espécie *P. vulgaris*. O Paraná é o principal Estado produtor de feijão do país. A produção paranaense, considerando-se as três safras, é estimada em 768 mil toneladas, o que corresponde a 21% da produção brasileira, de 3,7 milhões de toneladas, para a safra 2008/2009, segundo a CONAB. Minas Gerais é o segundo maior estado produtor, respondendo por aproximadamente 16% da produção nacional, com 607 mil toneladas. O Brasil é também o maior consumidor dessa leguminosa, sendo a média atual de consumo de feijão de 12,7 kg brasileiro/ano (Embrapa arroz e feijão, 2009).

O plantio de feijão no Brasil é dividido em três safras anuais. A primeira safra, também conhecida como safra das “águas” tem seu plantio entre os meses de agosto a dezembro. Tal safra recebe esse nome porque a colheita está concentrada numa época de constantes chuvas, nos meses de dezembro a março. A safra de 2008/2009 registrou uma produção de 1.383,2 mil toneladas, 11,2% maior que na safra anterior. A segunda safra, ou safra da “seca” é semeada entre os meses de abril e agosto e a colheita ocorre entre os meses de abril e julho, período onde ocorre escassez de chuvas, tendo sua produção total estimada em 1,4 milhões de toneladas. A terceira safra, ou safra do “inverno”, em que predomina o cultivo de feijão irrigado, é semeada de abril a maio, sendo ofertada entre julho e outubro. Estima-se que a produção total da terceira safra de 2008/2009 corresponda a 790 mil toneladas (CONAB). Embora esses períodos possam apresentar variações de ano para ano, pode-se identificar que há colheita praticamente o ano todo, e que existe sobreposição de épocas em algumas regiões.

Vários fatores são importantes para a obtenção de produto de qualidade, envolvendo cuidados que vão desde a fase de pré-produção, como a seleção da época mais adequada ao plantio, até a fase de comercialização, envolvendo questões

relacionadas ao armazenamento. Algumas características como a cor, o tamanho e o brilho do grão, podem determinar o seu consumo e comercialização. A preferência do consumidor norteia a seleção e obtenção de novas cultivares, exigindo destas não apenas boas características agrônômicas, mas também valor comercial no varejo. Seu cultivo é realizado em sua maioria por pequenos produtores, e apesar do Brasil ser um dos maiores produtores desse grão, a importação ainda se faz necessária para atender as necessidades de toda a população (Embrapa arroz e feijão, 2009).

Uma das causas dos constantes insucessos, em nosso meio, na cultura do feijão, é a ocorrência de doenças transmitidas pelas sementes. O feijoeiro é hospedeiro de diversas doenças de origem fúngica, bacteriana e virótica. Entre as principais doenças fúngicas do feijoeiro comum encontram-se a antracnose, a mancha-angular, a ferrugem, o oídio e a mancha-de-alternária, além de duas outras recentemente identificadas nesta cultura e denominadas de sarna e carvão. As doenças mais importantes de origem bacteriana são o crestamento-bacteriano-comum e a murcha-de-Curtobacterium. Os vírus do mosaico-comum e do mosaico-dourado são as doenças viróticas de maior importância que podem ocorrer na cultura do feijoeiro comum. Com exceção da ferrugem, do oídio e do mosaico dourado todas as doenças, com maior ou menor intensidade, são transmitidas pelas sementes. Lavradores acostumados a usar sementes da própria lavoura, quase sempre infectadas de moléstias, inconscientemente estão espalhando os patógenos de uma geração a outra e de uma localidade a outra. Além disso, existem outras formas de disseminação de doenças, como vento, chuvas, insetos, animais, entre outros (Embrapa arroz e feijão, 2009). Desta forma, estudos voltados para o entendimento e controle de doenças do feijoeiro são de fundamental importância.

2.2. *Colletotrichum lindemuthianum*: agente causal da antracnose do feijoeiro

Colletotrichum é um dos mais importantes patógenos de plantas no mundo inteiro e causador da doença antracnose em diversos hospedeiros (Bailey & Jeger, 1992). O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Briosi & Cav., pertencente ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Sordariomycetes; Ordem Phyllachorales e Família Phyllachoraceae (Isaac et al., 1992) é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Apresenta ampla variabilidade genética, demonstrada pela variação encontrada nas características morfológicas e

culturais de diferentes isolados, já tendo sido identificados mais de cem raças espalhadas por todo o mundo (Rodríguez-Guerra et al., 2003; Souza et al., 2007). No Brasil existem mais de cinquenta raças, sendo que as mais frequentes no país nos últimos anos são 65, 73, 81 e 87 (Alzate-Marin & Sartorato, 2004).

Esse patógeno afeta plantas de feijoeiro em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes. Plantas mais jovens geralmente são mais susceptíveis ao ataque do que plantas adultas, assim como partes menos lignificadas (Araújo, 1988). Esta doença é de ampla distribuição, tendo sido constatada em vários países da Europa, África, Ásia e América. No Brasil, a doença ocorre nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba (Pria et al., 2003). É uma das doenças mais importantes do feijoeiro em Minas Gerais, particularmente nas regiões Sul e Zona da Mata (Vieira et al., 2006). Além de *P. vulgaris*, o fungo também é patogênico em outras leguminosas como *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (Zumeyer & Thomas, 1957). No gênero *Colletotrichum*, diferentes espécies podem estar associadas com a antracnose de um mesmo hospedeiro (Freeman et al., 1998).

Quando sementes infectadas germinam, são observadas lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo. As lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras. Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escura ou parda, que atingem inicialmente as nervuras principais até as nervuras secundárias à medida que a doença progride. Nas vagens, as manchas são arredondadas e pardo-escuras com bordas salientes pardo-avermelhada. Tais alterações no aspecto tendem a depreciar o produto, tornando-os indesejáveis ao consumo. Quando as condições ambientais são favoráveis, forma-se uma massa rica em conídios no centro das lesões de coloração rósea (Pria et al., 1999).

A antracnose é uma das principais doenças do feijoeiro, acarretando grandes perdas na produção. Sob condições favoráveis, como locais de temperatura amena (13-25°C), alta umidade relativa e chuvas, ele pode reduzir drasticamente a produtividade, levando a perda de até 100% (Chaves, 1980). A sobrevivência de *C. lindemuthianum* entre as estações de cultivo do feijão ocorre na forma de micélio dormente em sementes infectadas, nos cotilédones sob a forma de esporos, ou em restos culturais como micélio ou acérvulos. Sementes infectadas de cultivares suscetíveis são fontes primárias de inóculo, sendo responsáveis pela dispersão a longas distâncias (Vieira, 1983), tornando-

se geralmente descoloridas e com lesões de cor marrom quando infectadas. Em áreas onde os agricultores utilizam sementes de produção própria, há um aumento gradativo da quantidade de inoculo em cada ano, chegando a inviabilizar a produção (Peloso, 1992). Além da semente, outros agentes podem ajudar a espalhar esse patógeno, como a ação do homem, de inseto e respingos de chuva (Medeiros, 2004).

Este patógeno apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita. A classificação dos Ascomicetos baseia-se em sua forma de reprodução sexual (forma meiospórica). Porém, o agente etiológico da antracnose ainda não foi encontrado na natureza sob esta forma, tendo seu estado conidial sido descoberto primeiro (forma mitospórica) (Davide, 2006). A fase sexuada foi observada somente em condições de laboratório e é conhecida como *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*, pertence à classe dos Ascomicetos e ordem Diaportales. Kimati & Galli (1970) foram os primeiros a observarem a forma sexuada em laboratório por indução, no entanto, esta pode ser obtida facilmente pelo seu desenvolvimento espontâneo em cultivos de laboratório (Camargo Júnior, 2004). Os esporos sexuais ou ascósporos são resultantes dos processos de plasmogamia (fusão celular), seguidos de cariogamia (fusão nuclear) e divisão meiótica. São produzidos em corpos de frutificação ostiolados denominados peritécios e localizam-se dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco (Roca, 1997).

Na reprodução assexual, *C. lindemuthianum* produz os conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo. Apresenta micélio septado e ramificado e seus conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e oblongos ou cilíndricos (Sutton, 1992). Durante a germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, os quais podem formar apressórios em suas extremidades, ou continuar crescendo, formando as hifas e micélios (Ishikawa, 2006).

O ciclo infeccioso é do tipo hemibiotrófico, que se caracteriza por apresentar duas fases bem distintas, correspondentes aos dois modos de nutrição, biotrófico e necrotrófico, encontrados nos patógenos (O'Connell et al., 1985; Bailey et al., 1992). O processo de infecção tem início com a adesão de um conídio nas partes aéreas do feijoeiro e a sua germinação (Dufresne et al., 2000). O tubo germinativo se desenvolve pouco, e leva a formação do apressório. A maturação do apressório envolve a biossíntese de uma camada de melanina ao seu redor, essencial para o processo de penetração (Latunde-Dada, 2001). A partir do apressório forma-se uma hifa de penetração, que perfura a cutícula e a parede celular da epiderme da planta. A hifa de

penetração incha dando origem à vesícula de infecção, que se expande dando origem à hifa primária, localizada entre a parede celular e a membrana plasmática da célula. Esta primeira fase do desenvolvimento do fungo dura de 3 a 4 dias e é conhecida como fase biotrófica. As hifas primárias passam a colonizar novas células da epiderme e do mesófilo.

A segunda fase do processo de desenvolvimento corresponde ao aparecimento dos sintomas da antracnose, onde o fungo desenvolve hifas secundárias que crescem dentro e entre as células (Dufresne et al., 2000). Esta fase é conhecida como necrotrófica. As células do hospedeiro que possuem hifas primárias e secundárias sofrem a degradação da membrana plasmática e da matriz que envolve as hifas primárias. As hifas secundárias secretam enzimas que degradam a parede celular conforme vão avançando, levando a formação de lesões necrotróficas que, em estágios mais avançados, levam a maceração (Perfect et al., 1999).

O controle da antracnose em feijão é muito dificultado devido à eficiente transmissão do seu patógeno pela semente, da capacidade de sobrevivência durante vários meses no solo e em restos culturais infectados, bem como pela formação de escleródios, estruturas de resistência do fungo (Sutton, 1992, Dillard & Cobb, 1993). Medidas integradas e complementares como: o uso de fungicidas, controle biológico, tratamento químico de sementes, remoção dos restos culturais e rotação de culturas utilizando espécies não hospedeiras como, por exemplo, o milho, poderia apresentar resultados promissores (Medeiros, 2004). Uma das grandes dificuldades encontradas no controle desta doença é a ocorrência de diversas raças fisiológicas do patógeno, impossibilitando assim o uso em longo prazo de cultivares resistentes. A partir da observação desses problemas que envolvem o feijão e o fungo *C. lindemuthianum*, diversos pesquisadores vêm se esforçando para entender o processo de patogenicidade, tanto a nível celular quanto molecular.

O fungo *C. lindemuthianum* é um excelente modelo de estudo para o entendimento do processo infeccioso de fungos fitopatogênicos. Ele é de fácil manipulação e cultivo em laboratório, visto que a planta não é necessária para o desenvolvimento do fungo. Isso possibilita o isolamento de mutantes e a aplicação de técnicas de engenharia genética.

2.3. O sistema de dois componentes em fungos

Microrganismos podem alterar a sua morfologia, comportamento, metabolismo e transcrição de genes em resposta a alterações no ambiente em que se encontram, como baixa disponibilidade de carbono, nitrogênio ou fosfato, alterações na disponibilidade de aceptores de elétrons na respiração, mudanças na temperatura e osmolaridade. Dessa maneira, microrganismos podem sobreviver e se adaptar as mudanças nas condições do meio. Tais adaptações são devidas a sistemas de detecção nos quais continuamente ocorre o monitoramento do meio e transmitem-se sinais através da membrana para alvos intracelulares específicos, que podem levar à transcrição de genes, ativação de enzimas ou funcionalidade de componentes celulares, como a movimentação de um flagelo, por exemplo. Na maioria dos casos, o sinal causa a ativação ou inativação de fatores de transcrição citoplasmáticos, o qual usualmente ocorre por fosforilação ou defosforilação dos mesmos (White, 2000).

O sistema de dois componentes (TCS, *Two Component System*) foi identificado pela primeira vez na década de 80 na via de transdução de sinais de diversas bactérias (Nixon et al., 1986; Santos & Shiozaki, 2001). Contudo, já foram encontradas centenas desses sistemas em eubactéria, archaea e em alguns eucariotos (Stock et al., 2000). O sistema inclui uma histidina quinase (HK), que é uma proteína sensora, que recebe o sinal externo e transmite a uma proteína reguladora de resposta (RR), a qual, por sua vez, envia o sinal ao alvo. A proteína histidina quinase possui um domínio de reconhecimento de sinal, o qual sob dado estímulo, resulta em autofosforilação de um resíduo de histidina presente na região carboxi-terminal (compreendendo aproximadamente 240 aminoácidos), utilizando ATP como doador do grupamento fosfato. Em seguida, ocorre a transferência do grupo fosforil para um resíduo de aspartato na região amino-terminal (compreendendo aproximadamente 120 aminoácidos) da proteína reguladora de resposta, ativando-a. A maior parte das proteínas reguladoras de resposta possui domínio de ligação ao DNA e funcionam como fatores de transcrição quando estão fosforiladas, levando a indução ou repressão da transcrição de genes específicos. A via de sinalização também inclui uma fosfatase que defosforila o regulador de resposta, retornando ao seu estado não estimulado, onde mais uma vez pode responder a um novo sinal. Tal fosfatase pode ser a própria histidina quinase, o regulador de resposta ou outra proteína (White, 2000).

Assim sendo, de acordo com Stock et al. (2000), a via de transdução de sinal envolve três reações de fosfotransferência:

1. Autofosforilação: $\text{HK-His} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Fosfotransferência: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR}\sim\text{Asp} \leftrightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Desfosforilação: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

As proteínas HK sensoras podem se localizar na membrana celular, contendo um sensor extracelular ou podem estar no citoplasma, contendo um sensor intracelular (Bourret et al., 1991). Porém, é mais usual estarem presentes na membrana, enquanto as proteínas reguladoras de resposta, no citoplasma.

Em um sistema “simples” de dois componentes, a histidina quinase e a reguladora de resposta são proteínas separadas. Em eucariotos, as histidinas quinases são “híbridas”, o que significa que ambos HK e RR estão contidos em um único polipeptídeo. Tal sistema híbrido requer um passo adicional de fosforilação através de uma unidade de fosfotransferência (HPt) e uma segunda RR. O domínio HPt pode ser parte da proteína híbrida HK ou uma proteína separada (Catlett et al., 2003).

Catlett et al. (2003) realizou uma extensa análise comparando regiões conservadas (fosfoceptor e domínio de ligação ao ATP) de histidina quinases putativas presentes no genoma de diferentes fungos patogênicos. Os genomas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans* apresentaram uma, três e três HKs, respectivamente. Em contraste, a análise do genoma dos fungos filamentosos *Neurospora crassa*, *Cochiliobolus heterostrophus*, *Giberella moniliformis* e *Botryotinia fuckeliana* revelou que eles codificam uma extensa família de proteínas do sistema de dois componentes. O autor agrupou as HKs em onze diferentes classes, como demonstrado na Figura 1, e concluiu que o grande número de HKs encontrado sugere extensivo *cross talk* ou redundância entre histidina quinases.

Juntamente com a ETR1 de *Arabidopsis*, Sln1 de *S. cerevisiae* foi uma das primeiras histidina quinase sensoras descobertas em eucariotos, modulando resposta ao estresse osmótico nessa levedura (Santos & Shiozaki, 2001). Sln1 é uma histidina quinase híbrida e a única que possui um domínio transmembrana (Figura 1).

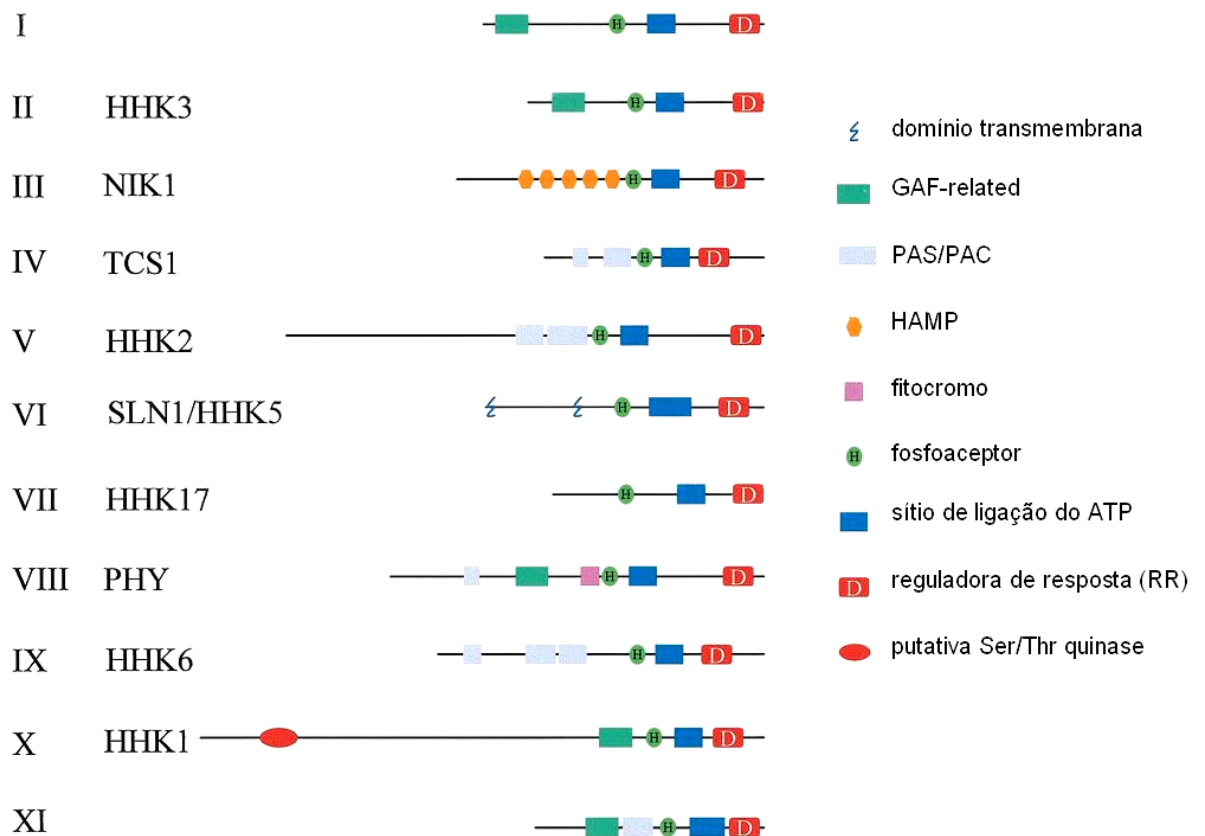


Figura 1: representação esquemática dos 11 grupos de histidina quinases existentes em fungos e seus componentes. Modelo extraído de Catlett et al. (2003), com modificações.

A proteína é organizada em quatro regiões distintas: (i) região N-terminal contendo dois domínios transmembrana separados por uma alça, em contato com o periplasma; (ii) uma região de ligação; (iii) o domínio histidina quinase; e (iv) um domínio receptor (Hohmann, 2002).

Sob condições normais (baixa osmolaridade), Sln1 autofosforila um resíduo de histidina em seu domínio catalítico. O grupo fosforil é então transferido para um resíduo de aspartato no domínio receptor e subseqüentemente para um resíduo de histidina em Ypd1, uma unidade de fosfotransferência (HPt). Por fim, o grupo fosforil em Ypd1 é transferido para um resíduo de aspartato do domínio receptor de Ssk1, uma proteína reguladora de resposta, completando a fosfotransferência His-Asp-His-Asp (Santos & Shiozaki, 2001). O sistema de fosfotransferência Sln1-Ypd1-Ssk1 é responsável por regular a resposta ao estresse osmótico por meio da cascata de sinalização HOG1 MAPK (High Osmolarity Glycerol - mitogen-activated protein kinase). Essa é uma das principais vias de transdução de sinais capaz de perceber o estresse osmótico e gerar uma resposta transcricional para a adaptação das células. Esta via foi descrita pela

primeira vez em *S. cerevisiae* e é relacionada à sinalização e adaptação ao estresse, virulência e formação da parede celular (Román et al., 2007).

A cascata de sinalização MAPK consiste de Hog1 MAPK, Pbs2 MAPK quinase (ou MAPKK) e as MAPKK quinases Ssk2 e Ssk22 (ou MAPKKK). Como mencionado anteriormente, sob condições normais de osmolaridade, Ssk1 é fosforilado, tornando-se inativo e incapaz de ativar a cascata Hog1 MAPK. Quando a osmolaridade extracelular cresce, Sln1 é inativada. Consequentemente, a forma não fosforilada de Ssk1 se acumula e ativa Ssk2 e Ssk22 MAPKKKs, estimulando a via Hog1. Estes MAPKKKs se autofosforilam e ativam o Pbs2 MAPKK. Pbs2 por sua vez fosforila Hog1 MAPK, o qual ativa a expressão de genes envolvidos na síntese de glicerol e resposta ao estresse. O aumento da osmolaridade intracelular causada pelo acúmulo de glicerol impede a perda de água da célula em ambiente com alta concentração osmótica. Essa cascata é essencial para microrganismos patogênicos por garantir sua sobrevivência e proliferação em hospedeiros susceptíveis (Blomberg & Adler, 1989; Maeda et al., 1995; Santos & Shiozaki, 2001; Bahn et al., 2006; Liu et al., 2008; Kramer et al., 2009). Em fungos filamentosos, duas classes de histidina quinases estão envolvidas com resposta a estresse osmótico: grupo III e grupo VI (Motoyama et al., 2008).

Ypd1 pode transferir seu grupamento fosforil para um segundo regulador de resposta, Skn7, cuja função é independente da cascata Hog1 MAPK. A proteína Skn7 possui um domínio de ligação ao DNA, podendo atuar como fator transcricional. O estímulo fisiológico no qual Skn7 é funcional aparentemente não é a mudança na osmolaridade, apesar de tal fato não ter sido claramente demonstrado. Linhagens de leveduras deficientes em Skn7 não mostraram alteração na resposta ao estresse osmótico, mas foram sensíveis a peróxido de hidrogênio, relacionando a função de Skn7 no estresse oxidativo (Santos & Shiozaki, 2001).

A caracterização do sistema de dois componentes em fungos mostrou seu envolvimento em diversas funções como: formação da parede celular, patogenicidade, dimorfismo, adaptação ao estresse osmótico e oxidativo, diferenciação celular, resistência a antimicrobianos, reprodução sexual e diferenciação morfológica (Nagahashi et al., 1998; Deschenes et al., 1999; Ostrander & Gorman, 1999; Clemons et al., 2002; Ma & Michailides, 2005; Motoyama et al., 2005; Bahn et al., 2006; Nemecek et al., 2006; Brown et al., 2007; Jones et al., 2007; Klein & Tebbets, 2007; Motoyama et al., 2008; Szeto et al., 2008).

Sln1 é a única histidina quinase em *S. cerevisiae* e sua atividade é essencial para a sobrevivência. Deleção de Sln1 causa desrepressão da via HOG, resultando em morte celular (Maeda et al., 1994). Curiosamente, o mesmo efeito não foi observado em *C. albicans*. Mutantes *sln1* de *C. albicans* foram capazes de crescer normalmente e formar hifa. Contudo, apresentaram baixo crescimento em presença de altas concentrações de NaCl (1,5 M). Tal resultado demonstra que Sln1 em *C. albicans* não é essencial para sobrevivência devido à presença de outras proteínas, possivelmente histidina quinases, para a adaptação a altas concentrações osmóticas (Nagahashi et al., 1998). Além disso, Sln1 tem função essencial no processo de patogenicidade de *C. albicans* (Yamada-Okabe et al., 1999).

A análise das sequências de genomas de diversos animais, inclusive o homem, não identificou qualquer sistema de fosfotransferência como o da histidina quinase. O envolvimento de HKs em importantes processos fisiológicos e sua ausência em animais faz a via de sinalização de dois componentes um alvo atrativo para agentes antimicrobianos (Catlett et al., 2003). Três grupos de fungicidas (phenylpyrroles, dicarboximides e hidrocarbonetos aromáticos) possuem como alvo a via de sinalização HOG, diretamente relacionada com a classe III e VI de HKs (Motoyama et al., 2008). Tal fato é reforçado pela elevada resistência a fungicidas juntamente com osmosensibilidade de mutantes HOG (Zhang et al., 2002).

O sistema de dois componentes é um sistema de sinalização que permite a integração de múltiplos sinais ambientais em uma via única de resposta, influenciando diversas características em fungos patogênicos. Seu papel no processo de patogenicidade em fungos fitopatogênicos ainda não foi claramente elucidado, tornando-se assim um campo promissor de estudo. Até o presente trabalho não foi descrito ainda qualquer histidina quinase no fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

2.4. Produção de melanina em *Colletotrichum* e sua associação com o processo de infecção

Diversos estudos com *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum* sp. indicam que o apressório está envolvido diretamente no processo de penetração por exercer uma pressão mecânica na superfície foliar. O desenvolvimento do apressório é subdividido em três diferentes estágios: diferenciação, maturação e função. A etapa de maturação

está envolvida com mudanças bioquímicas e biofísicas na parede celular do apressório, a qual adquire uma coloração escura por resultado da biossíntese de uma densa camada de melanina ao seu redor (Veneault-Fourrey et al., 2005).

Melaninas são macromoléculas de alta massa molecular formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos resultando em pigmentos de coloração marrom ou preta, embora outras cores já tenham sido observadas. São produzidas por uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. Não é possível fazer uma rigorosa definição da melanina, porque as técnicas bioquímicas e biofísicas atuais são incapazes de fornecer a completa estrutura deste polímero, devido ao seu grande tamanho, insolubilidade em meio aquoso ou em solventes orgânicos e a sua heterogeneidade, sendo impossível de analisar por estudos cristalográficos (Casadevall et al., 2000; Nosanchuk et al., 2003). A melanina não é apenas uma substância, e sim um grupo de diversas substâncias com propriedades similares e que estão fortemente ligados com o processo de infecção de diversos fungos fitopatogênicos (Langfelder et al., 2003). Além de contribuir para a virulência do patógeno reduzindo sua susceptibilidade a mecanismos de defesa do hospedeiro e a drogas anti-fúngicas (Taborda et al., 2008).

Os dois tipos mais importantes de melanina são DHN-melaninas e as DOPA-melaninas. As DHN-melaninas são assim denominadas porque um dos intermediários da sua via sintética é o 1,8-dihidroxi-naftaleno (Figura 2). Da mesma forma, as DOPA-melaninas, recebem este nome por terem como precursor a L-3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA) (Langfelder et al., 2003). Ambos os tipos estão associados com a patogenicidade (Perfect et al., 1998). Existem diferentes vias onde a melanina pode ser sintetizada, mas microrganismos produzem esse pigmento predominantemente via tirosinases, lacases, catecolases e poliketídeo sintase (PKS), sendo essa última mais comum em *Colletotrichum*. Pigmentos derivados dessa via são geralmente pretos ou marrons e referidos como DHN-melaninas (Taborda et al., 2008; Nosanchuk & Casadevall, 2003). A síntese das DHN-melaninas se inicia com a formação do 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno pela enzima poliketídeo sintase (PaPKS1). Este produto é então reduzido para scitalone por uma redutase. Scitalone é desidratado pela scitalone desidratase em 1,3,8-trihidroxi-naftaleno, o qual é reduzido até vermelone. Essa última é desidratada até 1,8-dihidroxi-naftaleno, sendo então polimerizado para formar a melanina por um processo ainda não elucidado completamente (Figura 2) (Eliahu et al., 2007; Coppin & Silar, 2007 e Langfelder et al., 2003).

Outras classificações são aplicadas às melaninas, sendo estas também divididas em três grupos, as eumelaninas, as feomelaninas e as alomelaninas (Bilisnka, 1996). As eumelaninas são pigmentos negros ou marrons, geralmente insolúveis, formados por complexos processos de polimerização envolvendo quinonas e radicais livres (Hamilton, 2002). As feomelaninas são pigmentos de cores mais claras como vermelho ou amarelo, podem ser obtidas de maneira semelhante às eumelaninas, mas cujos precursores são a tirosina e a cisteína (Bilisnka, 1996; Riley, 1997; Hamilton, 2002). As alomelaninas são formadas a partir da polimerização oxidativa de substratos fenólicos como catecol (Bilisnka, 1996).

Desde 1960 sabe-se que melaninas estão presentes em fungos. Mais recentemente foi descoberto o seu importante papel na patogenicidade de fungos. Em fitopatógenos como *Colletotrichum langenarium* e *M. grisea*, as melaninas são essenciais para a infectividade, porque são elas que permitem que o apressório exerça grande pressão para penetrar na superfície foliar (Money & Howard, 1996). Em *M. grisea* essa pressão foi calculada como equivalente a 8 MPa (Howard et al., 1991).

Thines et al. (2000) descobriram que essa pressão gerada pelo apressório de *M. grisea* é devido a síntese e acúmulo de glicerol em concentrações maiores do que 3.0 M, derivado de glicogênio e lipídios. O glicerol é retido no apressório devido à camada de melanina na sua parede, que retarda o efluxo do glicerol durante a pressão de turgor. O acúmulo do glicerol é dependente da quebra de glicogênio e lipídios como o triacilglicerol numa rota metabólica regulada pela proteína quinase A (PKA). O apressório é completamente melanizado, exceto pelo poro existente na região que fica em contato com o hospedeiro. A ausência de melanina nessa região do poro no apressório permite a liberação de enzimas que degradam a parede celular, facilitando a penetração (Howard & Valent, 1996). Interessantemente, existe ausência de pigmentação nas hifas de infecção que colonizam as células da planta (Taborda et al., 2008).

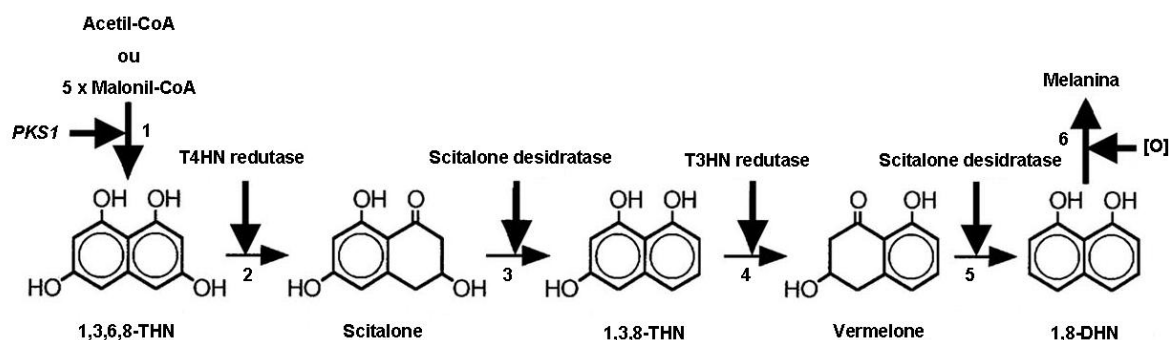


Figura 2: Representação esquemática da via biossintética da DHN-melanina, extraído de Eliahu et al., 2007, com modificações. *PKS1* (policetídeo sintase) inicia a rota convertendo Acetil-Coa ou Malonil-CoA em 1,3,6,8 – tetrahidroxinaftaleno. Passos dois e quatro são realizados por uma enzima redutase, e passos três e cinco são realizados por uma enzima desidratase. O passo seis é realizado pela enzima lacase, que oxida o 1,8 – dihidroxinaftaleno no passo final da biossíntese da melanina (Tsuji et al., 2001).

Em *Colletotrichum* ainda não foi desvendado como a pressão de turgor ocorre, mas o papel essencial da melanina no processo de penetração é reforçado pela perda de patogenicidade de mutantes de *C. lindemuthianum* deficientes na pigmentação, como descrito por Veneault-Fourrey et al. (2005). Perpetua et al. (1996) observaram que a biossíntese de melanina é essencial para a penetração do *C. lagenarium* no hospedeiro. O mutante 9141 (Thr-) deficiente na produção de melanina foi incapaz de converter 1,3,8-trihidroxinaftaleno em vermelone na via biossintética da melanina. Tal mutante formava apressórios não melanizados e tinha baixa infectividade nas folhas.

Em *C. lagenarium* foram identificados três genes envolvidos na via biossintética da melanina: *PKS1*, *THR1* e *SCD1*. Takano et al. (1995) obtiveram um mutante *Pks*⁻ não patogênico de *C. lagenarium* que apresentava pigmentação reduzida quando comparado com o isolado selvagem e apressórios não melanizados. O mutante foi incapaz de produzir policetídeo sintase, que converte Malonil-CoA em 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno. Os mesmos autores, em 1997, transformaram esse mutante com o gene *PKS1* de *Alternaria alternata*, recuperando sua capacidade de produzir apressórios melanizados e conseqüentemente sua capacidade de penetração. O gene *THR1* codifica a T3HN redutase envolvida na conversão de 1,3,8-trihidroxinaftaleno em vermelone (Perpetua et al., 1996) e o gene *SCD1* codifica a scitalone desidratase que catalisa a conversão de scitalone em 1,3,8- trihidroxinaftaleno na via biossintética da melanina (Kubo et al., 1996).

Um mutante de *C. lindemuthianum*, obtido por mutagênese insercional, apresentou coloração mais clara do que o tipo selvagem e incapacidade de induzir

sintomas no feijoeiro. Exames microscópicos mostraram a formação reduzida de apressórios e de melanização. Análises moleculares desse mutante indicaram a interrupção do gene *clap1*, que codifica uma putativa ATPase transportadora de cobre. A complementação do mutante com o alelo *clap1* do tipo selvagem restaurou ambas a patogenicidade e a pigmentação (Parisot et al., 2002).

Santos et al. (2006) isolou um mutante de *C. lindemuthianum* (isolado A₂ 2-3 da raça 89), utilizando a técnica REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). Após a seleção dos transformantes foi observado que um dos mutantes, denominado LVSa1 apresentava deficiência na produção de melanina. Santos et al. (2007) verificou que os apressórios desse mutante não apresentavam a camada de melanina normalmente observada e folhas de feijoeiro inoculadas com os conídios desse mutante apresentaram elevada redução dos sintomas característicos da antracnose. Foi comprovado, por meio de hibridização, que ocorreu uma integração única do plasmídeo pSM1 no genoma do fungo. Parte do plasmídeo inserido no genoma foi recuperado juntamente com as regiões que o flanqueiam e que correspondem ao gene de patogenicidade. Os plasmídeos recuperados foram seqüenciados e a análise das seqüências de aminoácidos não mostrou similaridade significativa com nenhuma proteína presente no banco de dados do NCBI.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Microrganismos e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados com o fungo *C. lindemuthianum* raça fisiológica 89, isolado A₂ 2-3, coletado no noroeste de MG (Lagoa Formosa) e cedido pelo Prof. Everaldo Gonçalves de Barros do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Brasil-MG. Foi utilizado também o mutante com deficiência parcial na produção de melanina LVSa1, obtido pela transformação da linhagem selvagem com o plasmídeo pSM1 empregando a técnica REMI (Santos et al., 2006). Para o ensaio de patogenicidade foi utilizado o cultivar de feijoeiro susceptível Rosinha. Os fungos foram cultivados e mantidos em meio BDA enriquecido (pH 6,8, composto do caldo de 250 g de batata cozida enriquecido com 1 % de glicose, 0,2 % de extrato de levedura, 0,2 % de peptona, 0,15 % de caseína hidrolisada, 1,5 % de ágar) e incubados a uma temperatura de 22 °C. Para a manutenção do mutante foi utilizado o meio BDA acrescido de 80 µg/ml de higromicina B.

Também foram utilizadas as linhagens bacterianas *E. coli* LE392 (Promega®) e *Escherichia coli* DH5α (Stratagene®), pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa, as quais encontram-se estocadas à -80 °C em glicerol 40 %. O estoque das bactérias transformantes obtidas nesse trabalho também foi mantido nas mesmas condições. Quando necessário, essas linhagens foram ativadas à 37 °C por esgotamento em meio de cultura LB (Luria-Bertaini).

3.2. Triagem do gene de patogenicidade a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum*

Para a triagem do gene de patogenicidade foi utilizado o banco genômico de *C.*

lindemuthianum construído a partir do *Lambda EMBL3/BamHI Vector Kit* e que encontra-se armazenado à 4 °C (Soares, 2007). Foi utilizada a metodologia descrita por Benton & Davis (1977), de hibridização de DNA em placas de lise, a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum* construído no fago λEMLB3 e da linhagem bacteriana *E. coli* LE392 (Promega®). Para a triagem do banco foi utilizado como sonda o plasmídeo pRescue24, recuperado do genoma do mutante e que contém parte do gene interrompido (Santos et al., 2006). As placas de lise foram transferidas para membranas de náilon (Duralon-UV Membranes, Stratagene). As sondas foram marcadas a frio utilizando o kit “AlkPhos Direct Labeling and Detection Systems with CPD-Star” (GE Healthcare®), e a hibridização foi realizada conforme instruções do fabricante.

3.3. Extração de DNA dos fagos recombinantes e hibridização

A extração de DNA dos fagos recombinantes positivos isolados do banco foi feita a partir das placas de lise resultantes de células de *E. coli* LE392 infectadas com os fagos, utilizando o método PEG/NaCl descrito por Sambroock et al. (1989). Os fagos obtidos foram confirmados por reação de PCR usando os oligonucleotídeos alb1F e alb1R (Tabela 1), construídos com base na sequência presente no plasmídeo pRescue24. O DNA dos fagos obtidos foi clivado com as enzimas de restrição *ClaI*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI* e *SalI* e separado por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de DNA foram transferidos para membranas de náilon (Duralon-UV Membranes, Stratagene) por capilaridade, utilizando SSC 10X (Sambrook et al., 1989). A hibridização foi feita utilizando as mesmas condições da triagem (Southern, 1975). Como sonda foi utilizado também o plasmídeo pRescue24 (Santos et al., 2006).

3.4. Clonagem do gene de patogenicidade isolado

Após a análise do resultado da hibridização, o DNA dos fagos recombinantes positivos foi clivado com as enzimas de restrição citadas no item anterior e os fragmentos de interesse foram purificados utilizando o “*GFXTM PCR and Gel Band Purification Kit*” (Amersham Biosciences®), e clonados no vetor pBluescript KS⁻.

Alternativamente, foi utilizado a técnica de iPCR (PCR inverso) utilizando os oligonucleotídeos Clipcr1, Clipcr2 e Clipcr3 (Tabela 1), desenhados a partir da sequência presente do plasmídeo recuperado pRescue24. O DNA dos fagos

recombinantes isolados foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, que apresenta sítio de clivagem no interior da sequência onde os oligonucleotídeos foram desenhados, e os fragmentos totais foram ligados com a enzima T4 ligase (Promega®). O produto da reação de ligação foi utilizado como molde para a reação de PCR. Para esta reação de amplificação foi utilizada a *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy, utilizando o Kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®).

As reações de ligação de ambas as técnicas foram utilizadas para transformar células ultra competentes (Inoue et al., 1990) de *E. coli* DH5 α (Sambroock et al., 1989) e o DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o “*GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit*” (Fermentas Life Sciences®).

3.5. Obtenção da sequência completa do gene *slnCII*

Os clones identificados tiveram suas sequências obtidas pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger, 1977), utilizando o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*”. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen, localizada em Seoul, Coréia do Sul (<http://dna.macrogen.com>), utilizando o sequenciador automático Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer.

Os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) para o sequenciamento completo do gene *slnCII* foram desenhados utilizando o programa primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

A busca por seqüências homólogas foi realizada no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997). A busca por íntrons putativos foi feita manualmente por comparação com regiões consenso e com a análise do BLAST.

O programa DNAMAN foi utilizado para obter a proteína deduzida da sequência. Para a identificação e análise das regiões transmembrana foi utilizado o programa baseado no método de predição TMHMM do modelo de Markov (Krogh et al., 2001).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.

Nome	Sequência 5'-3'	Finalidade
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Sequenciamento
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenciamento e amplificação de sonda
M13F	GTTTTCCAGTCACGAC	Sequenciamento
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenciamento
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Sequenciamento
pIS2T3	GGAAGTTGAGCACACCGTTTT	Sequenciamento
pIS2T7	ATGGGCTGAGAAGACGAAGA	Sequenciamento
pHSAT3	GGAGCGAATGAGGGTATTCA	Sequenciamento
pHSAT7	CCAGCGCAACCTTGAAAGTA	Sequenciamento
histsp6	CCCTATGGTCCTCAACGAAA	Sequenciamento
histT7	GCCTTTTTGCTGATTTCGAG	Sequenciamento
alb1F	CTGGCGATGGTGTCTGACT	PCR
alb1R	CTTCTTGCACGCCAGTTTT	PCR e amplificação da sonda
Clipcr1	GCTCCCCGTCATAGTCTGAT	iPCR
Clipcr2	GGTCTGGACGGGAATCATC	iPCR
Clipcr3	ATGGGCTGAGAAGACGAAGA	iPCR

3.6. Análise filogenética do gene *slnCII*

Para a análise de reconstrução filogenética do gene *slnCII*, foram usadas sequências de nucleotídeos do mesmo gene pertencentes às diferentes classes de fungos e de outros grupos de histidina quinases já depositadas no banco de dados do GenBank (NCBI). O programa Clustal W (Thompson et al., 1994) foi utilizado para o alinhamento da sequências, sendo que algumas correções foram feitas manualmente de acordo com Tamura et al. (2007), utilizando o programa MEGA 4.0. Os organismos utilizados e seus números de acesso ao banco de dados do NCBI são: *Alternaria brassicicola* AY700098; *Aspergillus clavatus* XM_001268127, XM_001273136.1; *Aspergillus fumigatus* XM_745820, XM_001481590.1; *Aspergillus nidulans* AB036054.1; *Botryotinia fuckeliana* AY456054.1, Y456061; *Candida albicans* XM_711910; *Cochliobolus heterostrophus* AY456009, AY456004, AY456005, AY456008.1, AY456020, AY456006; *Clavispora lusitaniae* EF157662; *Gibberella moniliformis* AY456046, AY456035, AY456034, AY456049, AY456038, AY456039, AY456037.1; *Neurospora crassa* XM_959477, XM_959672, DQ128077, BK004088; *Neosartorya fischeri* XM_001258143; *Penicillium marneffeii* XM_002143307.1; *Talaromyces stipitatus* XM_002479605.1.

A fim de avaliar a qual grupo de histidina quinases pertence SlnCII foram utilizados dois métodos de reconstrução: Neighbour joining (NJ) e Máxima parcimônia (MP). As árvores de NJ foram obtidas utilizando o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) e bootstrap com 5000 replicações. As árvores de MP serão obtidas utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) por meio de uma busca heurística utilizando o algoritmo SPR (Subtree Pruning and Regrafting), utilizando bootstrap com 1000 replicações. Após obtenção das árvores com os diferentes métodos, elas foram topologicamente comparadas, para verificar se são ou não significativamente diferentes, de modo a obter uma árvore consenso.

3.7. Inativação do gene *slnCII*

A inativação do gene *slnCII* de *C. lindemuthianum* foi realizada por meio da integração e interrupção do gene pelo plasmídeo pIS2, obtido no item 3.4 e que carrega parte da região promotora e 256 nucleotídeos da região inicial do gene clonados no vetor pBluescript KS⁻.

O isolado da raça 89 foi cultivado em meio BD por cinco dias a 22° C sob agitação constante a fim de obter massa micelial. Para a técnica de transformação, aproximadamente 3g de micélio foram adicionados ao estabilizador osmótico KCl 0,8M (pH 5,8), preparado em tampão fosfato 10mM, e acrescidos da enzima Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum* (SIGMA®), na concentração de 15 mg/ml e BSA na concentração de 10 mg/ml e misturados sob leve agitação a 30° C durante aproximadamente 3 – 4 horas. Os protoplastos obtidos foram lavados, respectivamente, com ST (Sorbitol 1M, Tris HCl 10mM) e STC (Sorbitol 1M, Tris HCl 10mM, CaCl₂ 50 mM). A transformação foi realizada com a adição a suspensão de protoplastos obtidos a 5 µg do plasmídeo pIS2, 5 µg do plasmídeo pSM1, o qual codifica resistência a higromicina (Poggeler et al., 2003) e PEG 6000 (concentração de 25%) preparado em em STC. Os protoplastos transformados foram colocados para regenerar em meio BDA enriquecido contendo sacarose (0,56 M) como estabilizador osmótico e incubados a 22°C por aproximadamente 18 horas. Em seguida, foi adicionado 5 mL de meio BDA semi-sólido contendo higromicina na concentração final de 100 µg/mL, para a seleção dos transformantes. As placas foram incubadas novamente a 22°C até o aparecimento das colônias dos transformantes. Os transformantes resistentes à higromicina foram posteriormente purificados pelo isolamento monospórico.

3.8. Caracterização molecular do transformante

3.8.1. Obtenção de massa micelial

Conídios do isolado da raça 89 de *C. lindemuthianum* e do mutante obtido foram inoculados em placas de Petri contendo meio BD e incubadas à 22 °C durante 4 dias. Após incubação, o micélio foi coletado, lavado e congelado em nitrogênio líquido.

3.8.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total do isolado selvagem e do mutante foi realizada de acordo com Spetch (1982). O micélio obtido e congelado com nitrogênio líquido foi macerado em almofariz até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 400 mg foram transferidos para microtubos (1,5 mL) contendo 0,4 mL de solução de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8; SDS 2 %; EDTA 20 mM; NaCl 150 mM), previamente aquecido em banho-maria à 70 °C. O homogeneizado foi deixado no banho-maria à 70 °C por 15 minutos. Na etapa seguinte, foi adicionado a cada microtubo 350µL de acetato de potássio 5 M, homogeneizado e deixados em gelo por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados à 12000 g por 10 minutos e a fase aquosa transferida para novos tubos. Foi feita duas etapas de desproteíntização, uma vez em fenol:clorofórmio e uma vez em clorofórmio. A fase aquosa foi misturada com igual volume de isopropanol e deixada a -20 °C por aproximadamente 2 h no gelo. Após centrifugação a 12000 g por 10 minutos, o pellet foi lavado com etanol 70 % e colocado para secar a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em água ultrapura e tratado com RNase para uma concentração final de 50 µg/mL.

3.8.3. Análise da inativação do gene por hibridização

Para confirmar se ocorreu realmente a inativação do gene *slnCII* no mutante obtido foi utilizado como sonda um fragmento de aproximadamente 670 pb, resultante da amplificação de parte da região promotora e 256 nucleotídeos do começo do gene. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos T7 e alb1R e o plasmídeo pIS2 como molde (tabela 1).

Alíquotas de 5 µg de DNA total do selvagem e mutante foram digeridos com a enzima *Bam*HI, que não cliva o fragmento utilizado como sonda e *Hind*III, que cliva

uma vez. A determinação do padrão de clivagem da sonda foi feita utilizando programa NEBcutter2.0 (Vincze et al., 2003). Os produtos da digestão do DNA total foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Após fracionamento dos fragmentos de DNA, o gel foi mantido por 1 hora em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M), 1 hora em solução de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl pH 8.0 0,5 M), e o DNA foi transferido para uma membrana de náilon (Duralon-UVTM- Stratagene®). Após a transferência, o DNA foi fixado à membrana utilizando o aparelho UV Crosslinker UVC 500. A hibridização ocorreu seguindo as condições para a hibridização e detecção descritas no item 3.2.

3.9. Teste de patogenicidade

O ensaio de patogenicidade foi realizado de acordo com Dufresne et al. (1998), utilizando o cultivar do feijoeiro Rosinha, que é susceptível a antracnose. Para triagem inicial, folhas primárias, crescidas por dez dias a 23 °C, foram excisadas e colocadas em placas de Petri contendo discos de papel de filtro embebidos em água. Visando uma maior produção de esporos, foi feita a inoculação dos conídios do transformante obtido e do selvagem em vagem, seguida de incubação a 22 °C por dez dias. Uma suspensão de $1,0 \times 10^6$ esporos/mL dos fungos foi inoculada na região abaxial das folhas com o auxílio de um pincel estéril. As placas de Petri serão incubadas a 22 °C em câmara com 16 horas diárias de luz ($166 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Cada experimento teve três repetições. Os sintomas foram observados por dez dias para confirmar o fenótipo.

3.10. Determinação da osmosensibilidade e resistência a fungicidas do mutante *slnCII*

Para determinar a influência do gene *slnCII* na resposta ao estresse osmótico, as linhagens mutante e o selvagem foram cultivados em meio YGA (0,5 % de extrato de levedura, 2 % de glicose e 1,5 % de ágar) com alta concentração de açúcares e sais e incubadas a temperatura de 22 °C. Foram testados nesse trabalho: sacarose, glicose, manitol, glicerol, arabinose na concentração de 1 M; KCl, NaCl e CaCl₂ na concentração de 0,75 M. Para o teste de sensibilidade a fungicidas, os fungos foram repicados em meio YGA suplementado com ipridiona e PCNB a 12,5 ppm.

4. Resultados

4.1. Identificação, isolamento e clonagem do gene *slnCII*

No presente trabalho, o plasmídeo pRescue24 foi utilizado como sonda no isolamento do gene de patogenicidade inativado no mutante LVSa1 a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum*, construído no fago λ EMLB3. Utilizando a metodologia descrita por Benton & Davis (1977) de hibridização em placas de lise, foram isolados, após a terceira triagem, quatro fagos denominados clA, clD, clH e clI. O DNA dos fagos foi extraído utilizando o método PEG/NaCl descrito por Sambrook et al. (1989). Para confirmar se eles realmente carregam parte do gene de interesse, o DNA extraído foi usado como molde na reação de amplificação com os oligonucleotídeos alb1F e alb1R (Tabela 1). Esses oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência do gene de patogenicidade interrompido presente no pRescue24, e amplificaram um fragmento de 301 pb em todos os fagos isolados. Como controle positivo da reação, foram utilizados o plasmídeo pRescue24 e o DNA do isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* (material suplementar S1). Em seguida, o DNA dos fagos foi clivado com as enzimas de restrição *KpnI*, *HindIII* e *SalI*, por estas apresentarem sítios de restrição no fago λ EMLB3, permitindo que o inserto correspondente ao gene de interesse fosse liberado em um tamanho menor, o que facilitaria o processo de clonagem.

Os produtos da clivagem foram separados em gel de agarose 0,8 %, transferidos para uma membrana de náilon e hibridizados, utilizando o plasmídeo recuperado como sonda (material suplementar S2 e S3). Com base no resultado da hibridização, foram purificados do gel quatro fragmentos de DNA que apresentaram resultado positivo: (i) um fragmento de aproximadamente 2,6 kb, resultado da clivagem do fago clD com a enzima *KpnI*; (ii) um fragmento de tamanho estimado de 2,2 kb, resultado da clivagem do fago clD com a enzima *SalI*; (iii) um fragmento de aproximadamente 3,2 kb, resultado da clivagem do fago clH com a enzima *SalI* e (iv) um fragmento de tamanho estimado de 3,6 kb, resultado da clivagem do fago clI com a enzima *SalI*. Esses fragmentos foram clonados no vetor pBluescript KS⁻, dando origem aos plasmídeos pDK1, pDS1, pHS1 e pIS2. A análise das sequências presentes nos plasmídeos obtidos apresentaram alta identidade com o gene que codifica a proteína sensora histidina

quinase HHK5/sln1 em diversos fungos. Foi observado que a sequência presente no plasmídeo pRescue24 corresponde a região promotora do gene da histidina quinase. Esse resultado demonstra que o plasmídeo pSM1 foi inserido na região promotora do gene que codifica a histidina quinase no mutantante LVSa1 de *C. lindemuthianum* (Santos et al., 2006). A região do gene recuperado por Santos (2007) corresponde a uma porção da região promotora, situada a oitenta e três pares de bases do ponto +1 da tradução. Curiosamente, todos os plasmídeos obtidos continham apenas a região promotora e pequena porção do começo do gene.

Assim sendo, o DNA dos fagos cIA, cID, cIH e cII foi clivado com as enzimas de restrição *ClaI* e *NotI*. Essas enzimas foram escolhidas após o alinhamento da sequência de nucleotídeos do mesmo gene presentes em diversos fungos e análise do perfil de restrição pelo programa Ncbutter (BioLabs[®]). Esperava-se assim, predizer quais enzimas de restrição não clivariam o gene de interesse, tentando dessa maneira fazer a obtenção do gene completo. Os fragmentos totais foram separados em gel de agarose 0,8 %, transferidos para uma membrana de náilon e hibridizados (material suplementar S4).

Com base no resultado da hibridização, foram purificadas do gel três fragmentos de DNA distintos que apresentaram resultado positivo: (i) um fragmento de aproximadamente 3,9 kb, resultado da clivagem do fago cIA com a enzima *NotI*; (ii) um fragmento de aproximadamente 3,4 kb, resultado da clivagem do fago cID com a enzima *ClaI*; (iii) um fragmento de aproximadamente 6 kb, resultado da clivagem do fago cIH com a enzima *ClaI*. Esses fragmentos foram clonados no vetor pBluescript KS⁺, dando origem aos plasmídeos pAN1, pDN1 e pHCl.

Alternativamente, a técnica de iPCR (PCR inverso) também foi utilizada no isolamento de parte do gene que codifica a histidina quinase em *C. lindemuthianum*. Para isso, foi utilizado como molde o DNA dos quatro fagos recombinantes isolados do banco genômico, clivados a enzimas de restrição *BamHI* e os oligonucleotídeos Clipcr1, Clipcr2 e Clipcr3 (Tabela 1). Essa enzima possui sítio de restrição no interior de parte da região promotora usada como molde para a confecção dos oligonucleotídeos. Espera-se dessa maneira, a amplificação apenas do gene de interesse e não da região promotora. Foram amplificados nos fagos cIA, cID e cIH um fragmento de DNA de tamanho estimado de 2,2 kb. Como os fragmentos de DNA foram do mesmo tamanho, foi purificada somente o fragmento amplificado usando o fago cID como molde, por esse

estar mais intenso do que as demais. Esse fragmentos foi clonada no vetor pGEM-T Easy, dando origem ao plasmídeo pD3iPCR.

4.2. Sequenciamento e caracterização do gene *slnCII*

O sequenciamento dos plasmídeos pAN1, pDN1, pHCl e pD3iPCR foi realizado utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 e obteve-se a sequência completa do gene que codifica uma histidina quinase, que faz parte da classe Sln1, em *C. lindemuthianum*, e que foi denominado de *slnCII*. A figura 3 mostra a região codificadora do gene, bem como as regiões 5' e 3' que o flanqueiam. A sequência marcada em cinza na região promotora corresponde a porção do gene que foi recuperada do genoma do mutante LVSA1 e utilizada como sonda para o isolamento do gene completo. Ela está localizada a oitenta e três pares de bases do códon de iniciação ATG, que está destacado em negrito. Dentro dessa região foi encontrado o sítio CAAT-box, que é um cis-elemento consenso necessário para a correta e eficiente transcrição de um gene, e está situado a 260 pb do início do gene.

Na análise da sequência, foram encontrados 3 íntrons putativos interrompendo a região codificadora do gene *slnCII*: (i) o primeiro contém 51 pares de bases e está localizado na posição de gene 1828-1879; (ii) o segundo possui 87 pares de bases e está localizado na posição 2770-2854; e (iii) o terceiro íntron possui 89 pares de bases e se encontra na posição 3310-3399. Foram encontrados os sítios de splicing 5'GT e 3'AG típicos de sequências de íntrons em fungos (Kinghorn & Turner, 1992), representados na figura 3 com letra minúscula e sublinhados.

O códon de parada foi encontrado na posição 3781 e a análise da proteína deduzida da sequência revelou que ela possui 1184 aminoácidos. Utilizando-se a ferramenta Blastp, foram capturadas sequências de proteínas histidina quinase Sln1 dos fungos *G. moniliformis* (AY456037.1), *B. fuckeliana* (AY456054.1), *C. heterostrophus* (AY456008.1) e *A. nidulans* (AB036054). Ela foram alinhadas por meio do programa ClustalW (Thompson et al., 1994) a fim de se encontrar regiões consenso (figura 4). Com base no alinhamento, percebe-se que a proteína SlnCII de *C. lindemuthianum* é uma histidina quinase híbrida, ou seja, possui o domínio HK e RR no mesmo peptídeo,

cctaccctgaccctggcttcgggctgaacctcgtcttgggtggacctctgatcccagctcttcccgcggaatccactcccageggctcgttcatcttctctctcgtcttctcgtcttct
cagcccatttcgctccaccaactcgttcgccctccgcttcgaccgacatcgagaccattctctttcttgcacgcccagtttcatctcatcgacgaccocgacgatcttgccctggcccgaat
cccacgctcattacgatcctgtcgtccgcccaggtcctctgcccgtgaacactgggctccgctgctctgggggggtggcaatttcaacaacaaaacaacccttgccagctgaaagaagga
acgatttctgagattttgcccacatctcgcaacgcagccatcgaccgctcgtcaaagggcaaccgctgcccagagcccatccatcaacgcatccgaccacgacaccgcccagtcagacacc
atcgccagcgaacgtcaaccccaggtggatccagcaacgaccggcagacgatgattcccgtccagaccgcccaggtccccgtcatagctgatcgaaa**ATG**GGCGTCAGGATAGCCATT
CGAGAGCAGCTCGCCTTCCTCGTGGTGATTGCTGTTCTCGTCGGCTTGATGATCCTGTCCGTCCCCGTCTGGATCTACGTCAACCAGTTTCGTCAACCAGGTCGAGGGACCGGAGCTCGCCC
TCACTGCCTCGCTCAAGGCCTCGCGCATCTCCGCGGAGCTCGAGCTCGTCCAGACGAGCGGCATCACCATCTCGTCGAGAATCCTCATCCAGCAGTCCCTCTTCAACTTTTTACGATGGCAA
CCAGGTCGACGCCAATTGGGTCGACGCCAGGAGCGACCTCGACAGCGCCCTGAGCGTGGGCGCCCTCACCGCCTGTCCAGGCCAGAATCTATTCCCGCAACACCACCGGCAACCCCTAC
GGCCTCGTCAACGTCACCGGCTCAAAAATCCCCGACATTGAGCTGCCCTACGGCGGCCCCGACGGCGGCAAGGTCTTCTCTCCGATGTTCTTGGTGGGTACCCGCCGACCTCTATCCGA
ACATCACCTACGAGGATCTCGGCCGACAGAATCAGTATAGGAACAACACGCGGGCGTACGCTGCCAACGCGTTTTCCCGCGTTCGCATCTCCACCAACGGCGGGTGTGCTCGGCCCTAT
GGTCTCAACGAAACAGCTGCGCTCATGTCCATCACCGTCCCGATCCGCGACAACAACAGCAGGAGTTCATCGTCGGGTACATGACCATCATCGCCACGGCCAACTCCCTCATCGGCGTG
CGCAACTCCCGGAGGGTCTCGGCGACACCGGCATCGTCTCTCGCCGGGCGACGAATGCCTCCAACAGGTTTTCCCGCGAGCATCCCGTCAGCAACGCCACCTTTCTGCCGATAGAG
ACTCTCGAGCGAGGTGCCCGTGAAGTTCGTCTCGCCCGAATCCCTGGACGGCCAGGCCGACAGACACAACGACCCGGAGCTGGGAGAGCAGCAAGGACGACATGCCTTTCCCGATGAA
GGACTACCCGGCCATTTTCGATTCTTTTCGAAACGATTCTCTCTCCCAACAATTCGAGCTCGTTGCTGTCCACGCGCAACGAGCAGGGTCTCCCGGTGCGCGTGGGCTTCGCCAGGACC
AACACGGCCCTCGTCAACTGGACGGTCTGTCGTCGAGCAGGCCAAGTCGGAGGCCGACGCCCCATTGACACGCTGCGCAACATCATTCTGGGCTGCGTCTTCGGCACGGCGGGTCTCATCA
TCATACTCATCTTCCCTGCGCCACCTCAGCGTCATGCCATCCGGAGGCTAAAAGTCGGCGACGGAAAAGACGGTCCAGCCGCCGGGCTACGAGGACTCGGACTACGCAGACTTTGACGA
CGACGGGACCCAGGCTCGGGCGCCATCTCGTCCCGGTCTCAGAGGTCGCGCAAAGACGGACTGGTTCGCGTTCATCTACAAGATTGTTCGGCTACAAAACCGAGGGAGAAGGCGCCGTCCGAG
CACGATCGCGAATCGACACGTCGCATCTTCAAGATCCCCGGCAGGGTGGACGACCCGAAGCACTTTGTCCACCGACGAGCTTACCGAGCTGACAGAGACGTTCAACGACATGAGCGACGAGC
TGTGCAAGCAGTACATCTCGCTGGACAAAAAGGTCCTCGAGCGCACGCGGAGCTCGAAATCAGCAAAAAGGCCGCCGAGGCCCAACGAGAGCAAGACGCTCTTCAATTGCCAACATATC
CCACGAGCTCAAGACGCCGCTCAACGGCATCTGGGCATGTGCGCCGTCTGCATGGAGGAGGACGACATTTCTCAGGATCAAGCAGTCTCTCAAGACGCTGTACAAGTCAGGTgtgtagtcg
ccccttgcgtctccggctttcccggcccctaacgacgacgagGATCTGTGCTCCACCTGCTCGAGGACCTCTGAGCTTCTCCAAGAACCAGATCGGCCAGCAGCTCAACCTCGAAGAGA
GGGAGTTCGCCCTCGCCGACATCAGGTCGAGATCCTGACCATCTTTGACAAGCAGGTGAGAGAGGGCAGGATCACGCTGACGGTCGAGTTCCTCAACTCTGAAGTCATCGAGCTGAGCAG
CAGCCCGGAGAGGAGGAGCACGGATACGCGACTGCCGGCTCTGGGCCCCACGGCACAGGCAGGCTCAAGGACATGTGTCTCTGGGGCGACCAGCACCCGATCCTCCAGGTCATCATCAAC
CTCGTTAGCAACAGCTTGAAGTTCACGCCGGCAGGCGGGCCGGGTCGACGTCCGCATCAAGTGCATCGGCGAGGTCGAGATGCCGGCCCCAACGAGAACGGCAGCCGGTCTCTCTTTT
CAAAGGAGTCTAGGAGACAGGCAGGTCGCGGCACCGCATCCGATCCAGCTCGACGCAGTCCGTCAGCTCCAAGGCCAACTCGACGACCCGAGCCCGTCAAGGGCACCGCACTCTCCATCAA
CCCCTGAGGCCAAGTCGACGCCGACATCCACGTCCGCGAACGGTCGCCCCACGCCCCCGCCGGGGCGCAAAGTTCGTACATCTTCGAGTTCGAGGTGGAGGACACGGGCCCCGGGCATC
GCGGAGCACATGCAGCAAAAAGGTTTTTCGAGCCGTTTCGTCCAGGGCGACCTCGGCCTGAGCAAGAAGTTTTGGCGGGACGGCCCTGGGGCTGAGTATCTGCCACCAGCTGGCGACGCTCATGG
GCGGCTCCATCTCCTTGAGGAGCACCGTCCGGCTGGGCACCCACTTTAACAATGCAGATACCGCTCAAGTATGTCAAGGACAGGTGCGttggccaagcagcagagtagccgaaccaactgag
aaacaatgctgaccaacgtagggcgtccagcagggcgtcgagcagcatcaagTCGCGGCCGCCAGCGTGGACGTGGCGGACCCTTCAGAGCTCTCCCAACAACCCCAAGCGCAACTCCGGG
GGGACCCCGTTGAAGCCGACGGCCATCAAGCCCGCTGGCGAGACCACGGCCAAGACCCTGCTGGAGCAGCAGCCGCGGCTGGTCCGCATGAGCCAGCCCTTCTTCGCGTCCAACCCGGCGC
CCAAGGCGAAGCGGAGCACAAAAGACATGGCGGCCATTGACGCGGCCATGGCGTCCAAGGGCGAAAAGGGCGGGCGGCTGCGGGTGTCTCGTCGCGACGACAACCTCGACCAACATTGA
GGTGGTCAGCAAGATGCTCAAGCTCGAGGACGTGTGCGACGTGACGGTTGCCAAGGACGGACAGGAGGCGTACGACCTCGTCAAGGCCAACATGGACGTCAACCAGCGGTTGGACGTATC
TTCATGGACATTCAGATGCCGgttgccaaggacggacaggagcgtacgacctcgtcaaggccaacatggacgtcaaccagcgggttcgacgtcatcttcatggacattcagATGCCGAACCT
CGACGGGCTGCAGTCAGCAAGCTGATCCGCAAGATGGGCTACAAGGCGCCCATCGTGGCGCTGACGGCTTTTTCCGAGGAGAGCAACGTCAAGGAGTGCATCGAGAGCGGCATGGACGAG
TTCCTCAGCAAGCCATCCGGCGGCCGGCGCTCAAGCAAGTGTCAAGAAGTTTTGCGACCATCCCGGAAGAGCCTGAGACGGCCAGCCTCACGCGCAAGACGACGCCCCGAGCGACCCCCGC
CGGAGCACCCAACGGCCCCCGGGCCAGGCTCTTTGGCGAAAAGGGCGACGCGATCGAGCCCAACGGCAAGGCACCGGCGCCACCGTCCGCCCGCCGTGCGAGCAGTACCTCTCGGAGAA
GGGACCTGA

Figura 3: Sequência de nucleotídeos do gene *slnC11*, que codifica um histidina quinase em *Colletotrichum lindemuthianum*. A região codificadora de gene tem início com o códon de iniciação ATG, destacado em caixa preta. A região destacada em cinza na região promotora corresponde a região recuperada do mutante LV5a1. O cis elemento CAAT-box está destacado em preto. A região codificadora do gene está em letra maiúscula e a região promotora do gene em letra minúscula. Os íntrons então representados por letras minúsculas e sublinhados, sendo que as regiões 5'GT e 3'AG estão destacadas em negrito.

e contém todas as regiões típicas conservadas em histidina quinases: as regiões H-box, N-box, G1-box, F-box, G-box. No domínio H-box foi encontrado um resíduo conservado de histidina, destacado em negrito na figura 4, e esse corresponde ao sítio de autofosforilação da histidina quinase quando esta recebe estímulo. Esse domínio também é o sítio de dimerização da proteína e em *C. lindemuthianum* está localizada entre os aminoácidos 543-563. Nas regiões 699-723, 796-814, 822-830 e 837-847 estão localizados os domínios conservados N, G1, F e G2 boxes, respectivamente. Os quatro motivos N, D, F e G boxes estão envolvidos com ligação ao ATP e provavelmente também na catálise e fosfotransferência (Wolanin et al., 2002). Na região N-box foram encontrados resíduos conservados de asparagina e nas regiões dos boxes G1 e G2, resíduos de glicina, que são característicos desses domínios e estão associados a sua função (Karniol & Vierstra, 2004). Os domínios de ligação ao ATP em HKs tem homologia em sequência e estrutura com outras famílias como topoisomerases tipo II (como a DNA girase B), proteína de reparo MutL e a proteína heat-shock Hsp90. Estes domínios formam uma família com uma estrutura conservada de várias α -hélices empacotadas sobre uma face de uma folha β grande e, em sua maior parte, antiparalela, formando uma alça que se fecha sobre a ligação de ATP.

Ao final da sequência de aminoácidos, na posição 1025-1097, foi encontrado o domínio regulador de resposta, que é responsável por receber o grupamento fosforil do resíduo de histidina presente no H-box. Ele é fosforilado em um resíduo de aspartato e é responsável pela posterior transferência até Ypd1, uma unidade de fosfotransferência (HPt), para completar a via de sinalização por fosfotransferência His-Asp-His-Asp.

Sln1 é a única das 11 classes de histidina quinase que possui domínios transmembrana em sua proteína. Foi realizada uma análise de predição de regiões transmembrana da proteína SlnC11 por busca de aminoácidos hidrofóbicos com o método TMHMM, baseado no modelo de Markov (Krogh et al., 2001). As regiões transmembrana compreendem os resíduos de aminoácidos localizados nas posições 9-33 e 396-420 e estão destacados na figura 4, juntamente com as demais regiões importantes citadas.

A

	<u>Região transmembrana</u>		<u>Região transmembrana</u>	
	9	33	396	420
<i>Colletotrichum</i>	VRIAIREQLAFLVVI	AVLVGIMILSV	PVWVIYV	NQFV
<i>Gibberella</i>	MRIAIREQLAALVLL	AVLISLAVVSI	PTWIVVNR	FV
<i>Botryotinia</i>	MRIGIRLQLGLVVL	VAAVPLIVL	LALATWFNNYS	F
<i>Aspergillus</i>	MRVPIAVQLGILL	VLLTALAGLA	AALAIATWINNY	NFV
<i>Cochliobolus</i>	MRIPIREQLGCLVLL	ASTIGLAWAVAT	WLTNHDFV	
	:*: *	**.:*::	* ::::.*:	*, **:*:*. ***** : : * ** * **

	<u>H-box</u>		<u>N-box</u>	
	562	581	699	723
<i>Colletotrichum</i>	ANESKTLPIANI	SHELKTPLNGI	LKDMCLWGDQHRILQVI	INLVSNLKEFPAG
<i>Gibberella</i>	ANESKTLPIANI	SHELKTPLNGI	LKDMCLWGDQHRILQVI	INLVSNLKEFPHN
<i>Botryotinia</i>	ANESKTLPIANI	SHELKTPLNGI	LKDMCLWGDQHRILQVI	INLVSNLKEFPAG
<i>Aspergillus</i>	ANESKTLPIANI	SHELKTPLNGI	LKDMVWGDQHRILQVIL	INLVGNSLKEFPDQ
<i>Cochliobolus</i>	ANESKTLPIANI	SHELKTPLNGI	LKDMILYGDQHRILQVIV	INLVSNLKEFPDQ
	*****		**** * :***** : : *****	

	<u>G1-box</u>		<u>F-box</u>		<u>G2-box</u>	
	827	835	843	851	858	868
<i>Colletotrichum</i>	FEFVEVDTGPGI	AEHMQQKVF	EPFVQD	LGLSKKFGGT	GLGLSICHQL	
<i>Gibberella</i>	FEFVQD	TGPGIPEHMQQKVF	EPFVQD	LGLSKKFGGT	GLGLSICHQL	
<i>Botryotinia</i>	FSEI	EVDTGPGIPEHLQ	RVFEPFVQAD	LGLNRKYGGT	GLGLSICSQL	
<i>Aspergillus</i>	LQF	EVDTGPGIQH	LQNRVFPFVQD	LRLNRKYGGT	GLGLSICSQL	
<i>Cochliobolus</i>	FEFVEVDTGPGI	PDHLHSKIP	EPFVQD	LGLSKKFGGT	GLGLSICSQL	
	: : ** : ***** : * : : : ***** * * * : * : ***** * * *					

	<u>Domínio regulador de resposta</u>					
	1025					1097
<i>Colletotrichum</i>	VAKDQGEAYDLV	KANMDVNQR	LDVIFMDI	-MENLDGLQ	STRKLI	RRMGYKAPIVAITAF
<i>Gibberella</i>	IAKDGQGEAYDLV	KATMEKNOAF	DVIFMDVQ	MENLDGLQ	STRLI	REMGYTSPIVAVTAF
<i>Botryotinia</i>	VAKDGQGEAYDI	VKQSMEEGKF	ENLIFMDI	QENLDGLQ	STRLI	REMGYSAIVTAF
<i>Aspergillus</i>	VVKDGQGEAYDT	VKANMEEGKVF	DLIFMDIQ	MENLDGIE	STRLI	RMGCSAPIVAVTAF
<i>Cochliobolus</i>	VAKDGQGEALDK	VKESMERQAPYN	LIFMDVQ	MENLDGLQ	STRLI	RQSGFSAPIVAVTAYAE
	: . ***** * * * . * : : ***** : ***** : * : . ***** : * : * * * * * : ***** *					

B

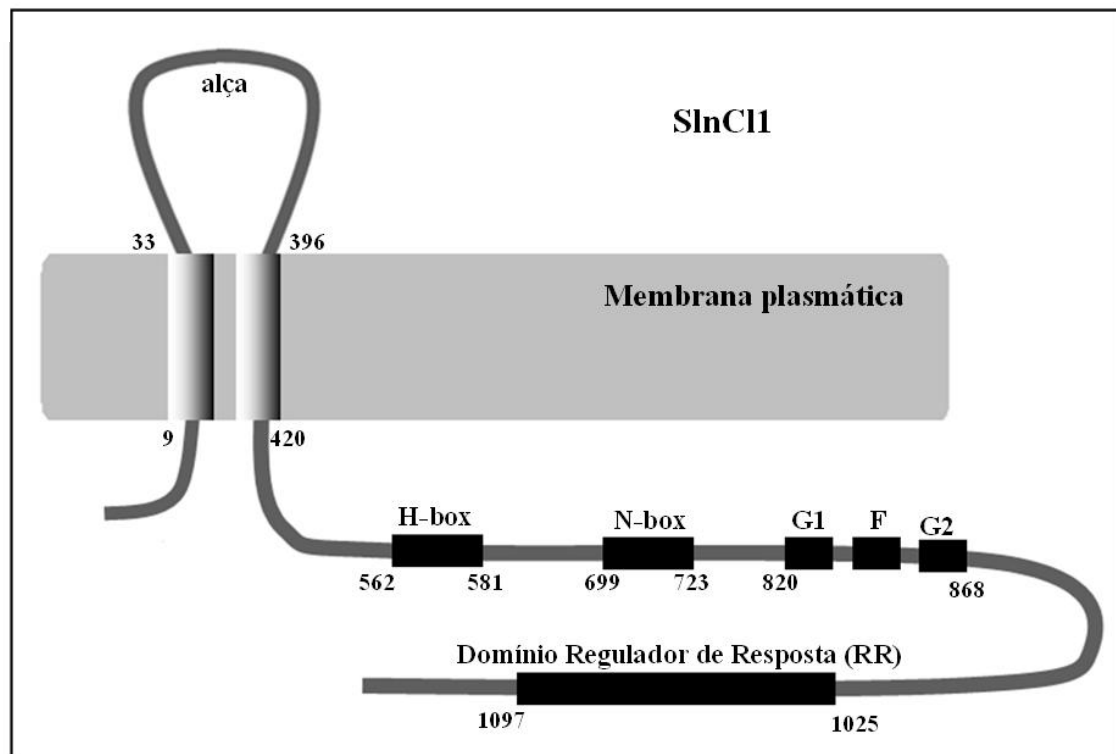


Figura 4: (A) Alinhamento entre a sequência de aminoácidos deduzida do gene *slnC11* com histidinas quinases *SLN1* de outros fungos. As regiões conservadas e outras regiões importantes foram destacadas em cinza. O resíduo de histidina no H-box, sítio de autofosforilação da proteína, foi destacado em negrito. Aminoácidos idênticos foram marcados com asteriscos. (B) Representação esquemática da proteína *SlnC11* de *C. lindemuthianum*, mostrando os domínios importantes para a função da proteína. Os números correspondem a posição relativa da sequência de aminoácidos.

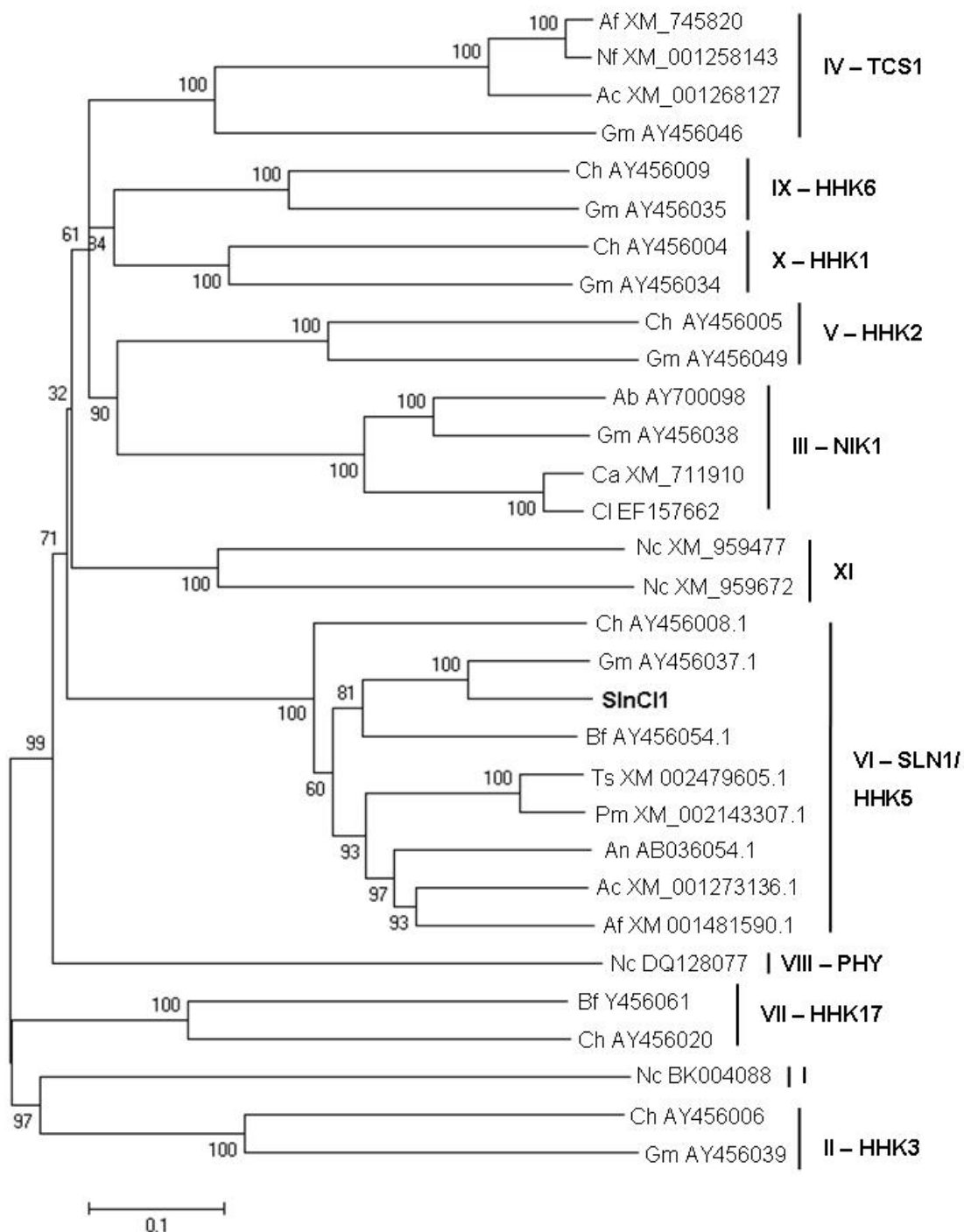


Figura 5: Análise filogenética utilizando a sequência da proteína SlnCl1. A árvore consenso foi construída utilizando o programa MEGA 4.0. O método de reconstrução adotado foi o Neighbour joining, com bootstrap de 5000 replicações. Foram utilizadas as sequências de 28 organismos, de todas as classes de histidina quinases já descritas e depositadas no banco de dados do NCBI. Os números de acesso das sequências estão presentes na árvore, após o código de cada organismo: (Ab) *Alternaria brassicicola*, (Ac) *Aspergillus clavatus*, (Af) *Aspergillus fumigatus*, (An) *Aspergillus nidulans*, (Bf) *Botryotinia fuckeliana*, (Ca) *Candida albicans*, (Ch) *Cochliobolus heterostrophus*, (Cl) *Clavisporea lusitaniae*, (Gm) *Gibberella moniliformis*, (Nc) *Neurospora crassa*, (Nf) *Neosartorya fischeri*, (Pm) *Penicillium marneffei*, (Ts) *Talaromyces stipitatus*. Os nomes das classes estão indicados ao lado de cada agrupamento formado.

Cattlet et al. (2003) agrupou as histidinas quinases em 11 classes distintas, baseado em uma análise filogenética derivada do alinhamento dos domínios conservados dos sítios de ligação ao ATP e da região fosfoceptora. Foi realizada então uma inferência para determinar se o gene *slnCII* encontra-se filogeneticamente mais próximo a classe das histidinas quinases SLN1 ou a alguma outra classe distinta.

Para isso, foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI das sequências de diferentes proteínas histidina quinase de todas as classes já estudadas em diferentes organismos. Após alinhamento por meio do programa ClustalW (Thompson et al., 1994), foi construído uma árvore utilizando o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). O método de reconstrução filogenética adotado foi o Neighbour joining utilizando bootstrap considerando 5000 replicações. Foi também obtida uma árvore utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) por meio de uma busca heurística com o algoritmo SPR (Subtree Pruning and Regrafting), utilizando bootstrap com 1000 replicações. Após obtenção das árvores pelos dois métodos, elas foram topologicamente comparadas, para verificar se são ou não significativamente diferentes.

Os ramos da árvore que representam os grupos foram bem sustentados, apresentando, na grande maioria, altos valores de bootstrap, o que a torna mais consistente e robusta (Figura 5). Os dois métodos foram capazes de separar todas as proteínas em suas respectivas classes de HKs. *SlnCII*, conforme esperado, ficou agrupado dentro da classe VI de histidina quinases, que engloba SLN1 e HHK5, sendo o grupo sustentado por um valor de bootstrap igual a 100. Apenas a árvore obtida pelo método NJ está representada na figura 5. Algumas classes, como I e VIII tiveram apenas um representante para a análise, devido à baixa disponibilidade de sequências que esses grupos têm no banco de dados do NCBI, mas foi suficiente, pois o objetivo geral do estudo não era realizar uma análise filogenética e sim uma análise de agrupamento como base na sequência da proteína *SlnCII*.

4.3. Inativação do gene *slnCII*

Para confirmar que o gene *slnCII* tem envolvimento com o processo de infecção, foi realizada uma mutação sítio dirigida a esse gene no isolado A₂ 2-3, pertencente à raça 89. Como vetor de inativação gênica foi utilizado o plasmídeo pIS2, que carrega parte da região promotora e 256 pares de bases do início do gene. Juntamente a reação de transformação, foi utilizado o plasmídeo pSM1 (Poggeler et al., 2003), pelo fato

deste possuir o gene que confere resistência a higromicina, que é o antibiótico usado para a seleção dos transformantes. Pretendia-se nesse experimento, a integração do plasmídeo pSM1 no genoma do isolado selvagem de *C. lindemuthianum*, conferindo resistência, e também a ocorrência de inativação gênica mediada por integração via recombinação homóloga do gene *slnCII*. Foram obtidos 194 transformantes estáveis e selecionados seis que apresentavam deficiência na pigmentação. Após sucessivas repicagens, apenas um dos transformantes selecionados manteve o fenótipo de deficiência parcial na produção de melanina, característico do mutante LVSa1. O mutante obtido apresenta uma coloração mais clara em relação ao selvagem e só começou a apresentar sinais de melanização após 10 dias de repicagem, na porção mais central e velha de seu micélio, em contraste com o isolado selvagem, que apresenta melanização desde as primeiras fases do crescimento (figura 6).

Foi feita a caracterização molecular do transformante por meio de hibridização, para averiguar a inativação gênica de *slnCII* causada pelo vetor pIS2. Para isso, foi utilizado como sonda um fragmento de DNA de aproximadamente 665 pares de bases, resultado da amplificação do vetor pIS2 com os oligonucleotídeos T7 e alb1R (tabela 1). Esse fragmento carrega a porção inicial do gene da histidina quinase e uma porção da região promotora que o flanqueia. O DNA do selvagem e do mutante *slnCII* foi digerido com as endonucleases de restrição *HindIII*, que não apresenta sítio de clivagem no fragmento usado como sonda, e a enzima *BamHI*, que apresenta um sítio de restrição. Os fragmentos totais foram separados em gel de agarose e hibridizados. No transformante obtido foi verificado que a integração do vetor foi realmente direcionada ao locus do gene *slnCII*, pois na análise utilizando a enzima *HindIII* foram gerados dois fragmentos de DNA de tamanho estimado de 4,48 e 2,32 kb, em contraste com o selvagem que apresentou um fragmento único de 5,44 kb. O plasmídeo pIS2, usado como vetor de inativação, apresenta um sítio de restrição para a enzima *HindIII*, o que explica as duas bandas geradas (Figura 7A). Também confirma que não houve outra integração aleatória do plasmídeo pIS2 em outra região do genoma durante o processo de transformação. O resultado é reforçado pelo perfil observado na figura 7B. Como esperado, na hibridização do DNA selvagem foram observados dois fragmentos de tamanho estimado de 16 e 2,30 kb. Já no perfil do mutante foram encontradas três fragmentos de tamanhos 14, 4,30 e 2,30 kb (Figura 7B). A enzima *BamHI* apresenta sítio de restrição em duas porções do plasmídeo pIS2: na região promotora e na porção do sítio polylinker do vetor pBluescript KS⁺, onde foi

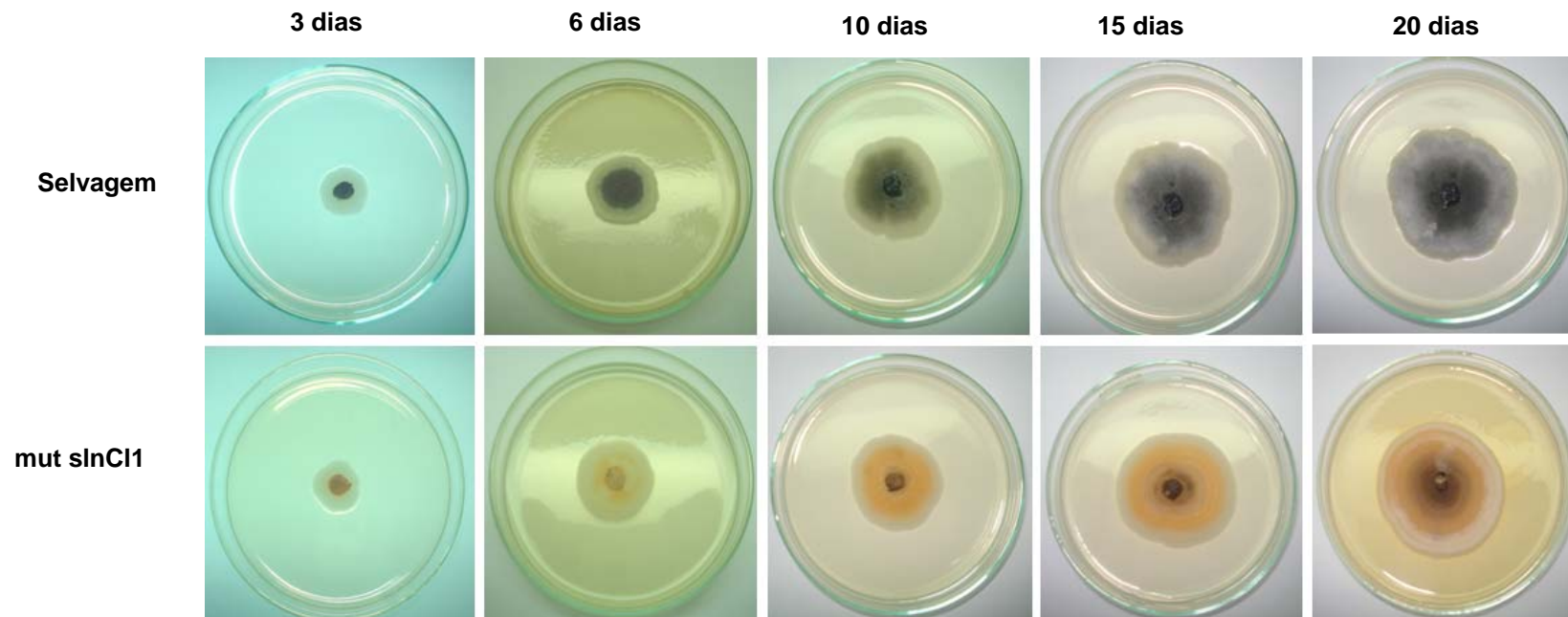


Figura 6: Colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* do isolado selvagem A₂ 2-3 da raça 89 e do mutante *slnC11*. As fotos foram obtidas após 3, 6, 10, 15 e 20 dias de crescimento. As placas foram incubadas a 22 °C, sob 16 h de luz.

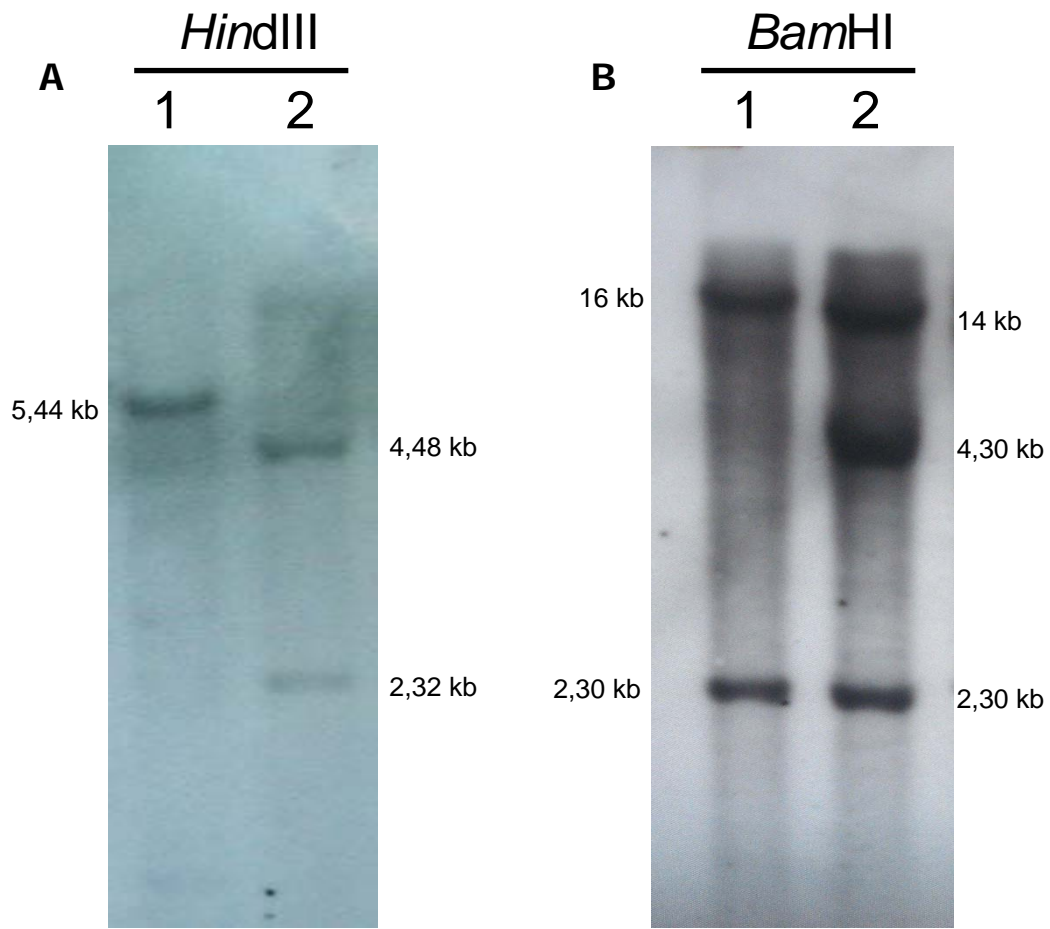


Figura 7: Análise do mutante *slnCII*. Estratégia utilizada na inativação gênica do gene *slnCII*. **(A)** Hibridização para averiguar a inativação gênica de *slnCII* causada pelo vetor pIS2. Auto-radiografia da hibridização da clivagem do DNA do (1) isolado A₂ 2-3, pertencente à raça 89; (2) transformante *slnCII* com as enzimas *HindIII*. e **(B)** *BamHI*.

clonado parte do gene de interesse. Assim sendo, acredita-se que a integração do pIS2 tenha ocorrido na porção do genoma que deu origem a banda de 16 kb na hibridização do selvagem, gerando um fragmento menor (14 kb) na hibridização do DNA do mutante. A banda de 4,3 kb corresponderia então a porção que contém o vetor pIS2 integrado e uma pequena porção da região do genoma; e como esperado, foi gerada uma banda de mesmo tamanho do selvagem (2,3 kb). O perfil das hibridizações obtidas indicam que no transformante com alteração na pigmentação, o gene *slnCII* foi interrompido por meio de uma integração do vetor pIS2.

4.4. Caracterização fenotípica do mutante *slnCII*

Para averiguar se ocorreu a perda da capacidade de infecção, conídios do transformante *slnCII* foram inoculados em folhas do cultivar de feijoeiro Rosinha, susceptível a antracnose, juntamente com o isolado selvagem como controle para a observação dos sintomas da doença. Após cinco dias de inoculação, as folhas onde foram inoculados os esporos do isolado selvagem começaram a apresentar necrose sobre as nervuras. O aparecimento macroscópico dessas lesões sugere o desenvolvimento de hifas secundárias nesse período, as quais secretam enzimas que degradam a parede celular conforme vão avançando. Isso leva a formação de lesões necrotróficas. Como esperado, as folhas inoculadas com os esporos do mutante *slnCII* apresentaram uma redução significativa dos sintomas da antracnose, nas folhas do cultivar Rosinha. Foram observadas pequenas lesões a partir do quinto dia, porém elas não evoluíram na extensão da parte afetada e nem houve maceração do tecido, quando comparada com as folhas inoculadas com conídios do isolado selvagem (Figura 8).

Discos de micélio de 6 mm do isolado selvagem e do mutante *slnCII* foram inoculados em meio YGA em diferentes condições e incubados a 22 °C, sob 16 h de luz. Após 12 dias foi medido o diâmetro de crescimento do micélio. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos diâmetros está mostrada nos gráficos das figuras 9, 10 e 11. A linhagem mutante *slnCII* mostrou grande sensibilidade a altas concentrações de açúcar, incluindo manitol, sorbitol, sacarose e glicose na concentração de 1M (Figura 9). Em contraste, não apresentou significativa sensibilidade a altas concentrações de sal, incluindo NaCl e KCl na concentração de 0,75 M. Curiosamente, o mutante *slnCII* apresentou um crescimento menor do que o selvagem em meio

suplementado com CaCl_2 na concentração de 0,75 M (Figura 10). Tanto a linhagem mutante quanto a selvagem se mostraram igualmente sensíveis ao PCNB, pertencente a família dos fungicidas hidrocarbonetos aromáticos e Ipridiona, pertencente a família das dicarboximides (Figura 11). Os dois fungicidas utilizados no estudo tem como alvo a via de sinalização HOG (High Osmolarity Glycerol).

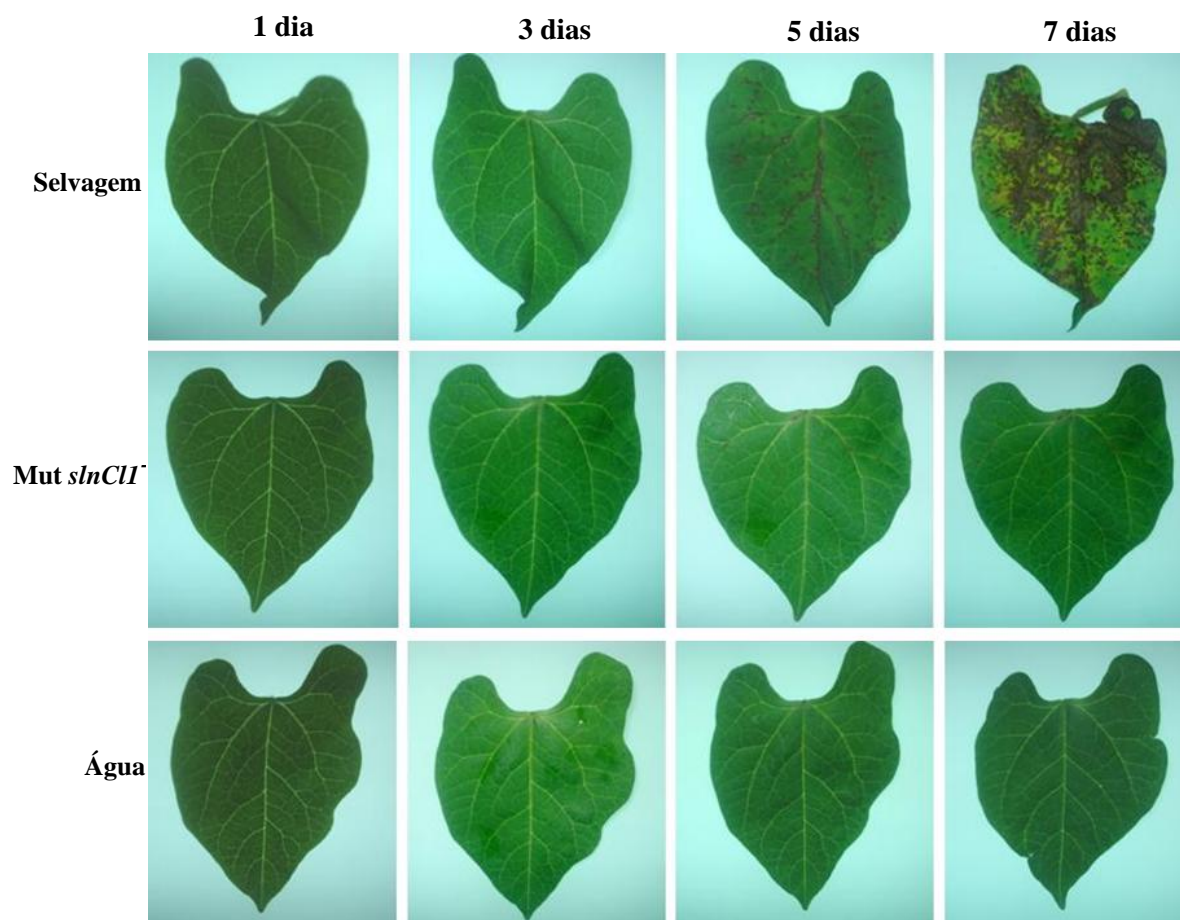


Figura 8: Teste de patogenicidade do mutante *slnCI1* e do isolado selvagem no cultivar susceptível de feijoeiro Rosinha. Folhas primárias foram excisadas e inoculadas assepticamente com suspensão de conídios do isolado A₂ 2-3 da raça 89 e do mutante. Foi realizado um controle negativo somente com água. As folhas foram mantidas a 22 °C, sob 16 h de luz por 7 dias.

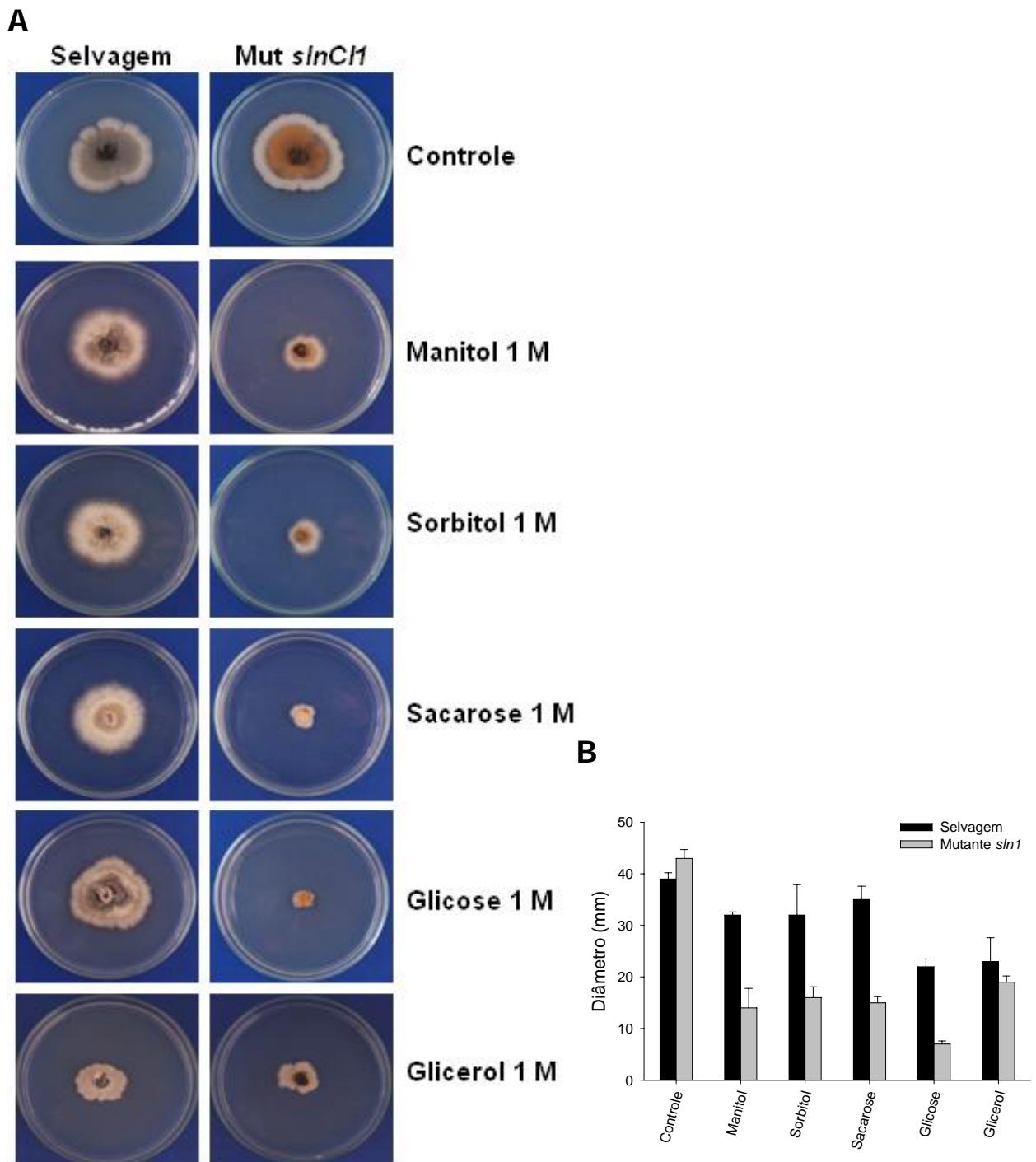
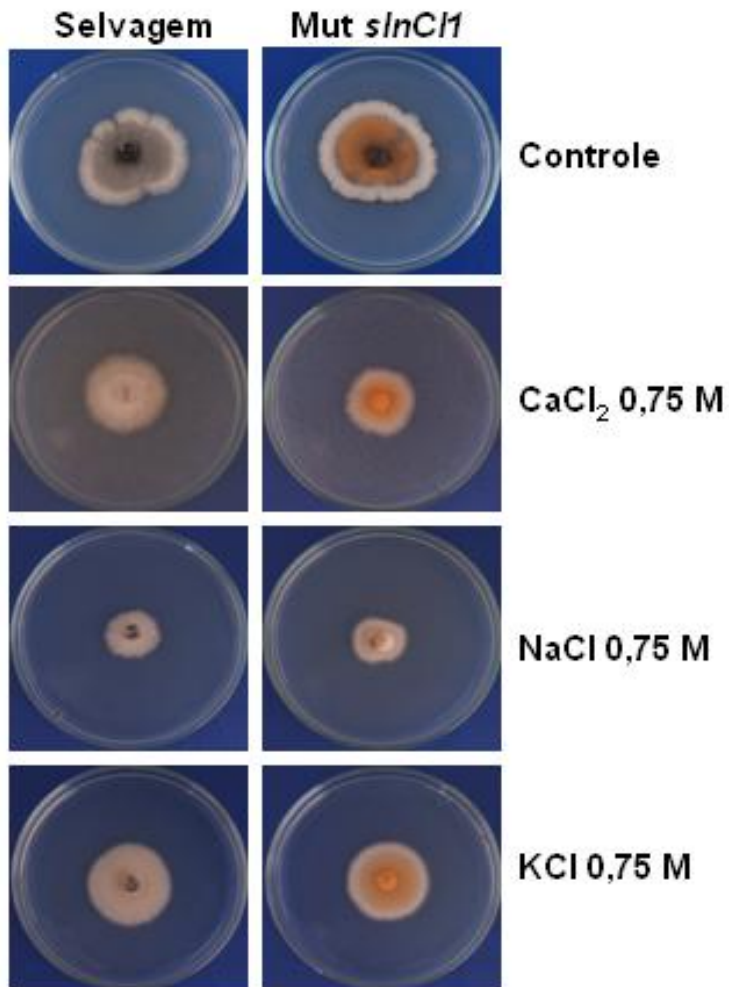


Figura 9: Efeito de alta concentração osmótica no crescimento da linhagem mutante *slnCI1* e do isolado selvagem. (A) Discos de micélio de 6 mm do isolado selvagem e do mutante foram inoculados em meio YGA suplementado com manitol, sorbitol, sacarose, glicose e glicerol 1M. As placas foram mantidas a 22 °C, sob 16 h de luz por 12 dias. **(B)** A média do diâmetro de crescimento do micélio em três placas foi utilizada para a construção do gráfico. As linhas sobre as barras indicam o desvio padrão.

A



B

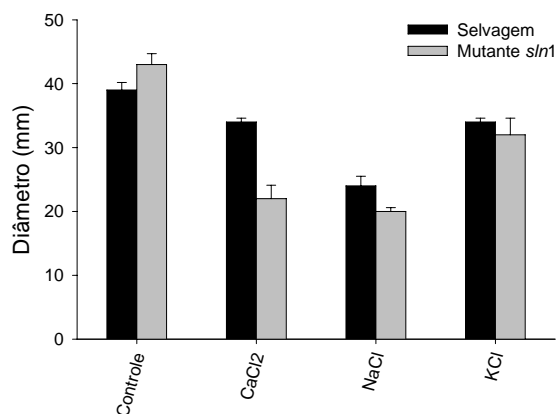


Figura 10: Efeito de alta concentração de sais no crescimento da linhagem mutante *slnCl1*- e do isolado selvagem. (A) Discos de micélio de 6 mm do isolado selvagem e do mutante foram repicados em meio YGA suplementado com CaCl₂, NaCl e KCl 0,75 M. As placas foram mantidas a 22 °C, sob 16 h de luz por 12 dias. **(B)** A média do diâmetro de crescimento do micélio em três placas foi utilizada para a construção do gráfico. As linhas sobre as barras mostram o desvio padrão.

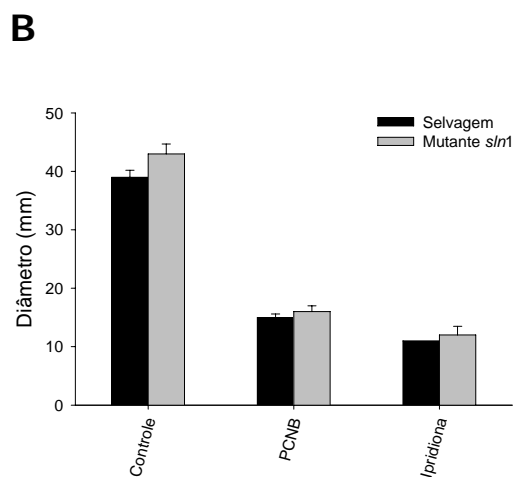
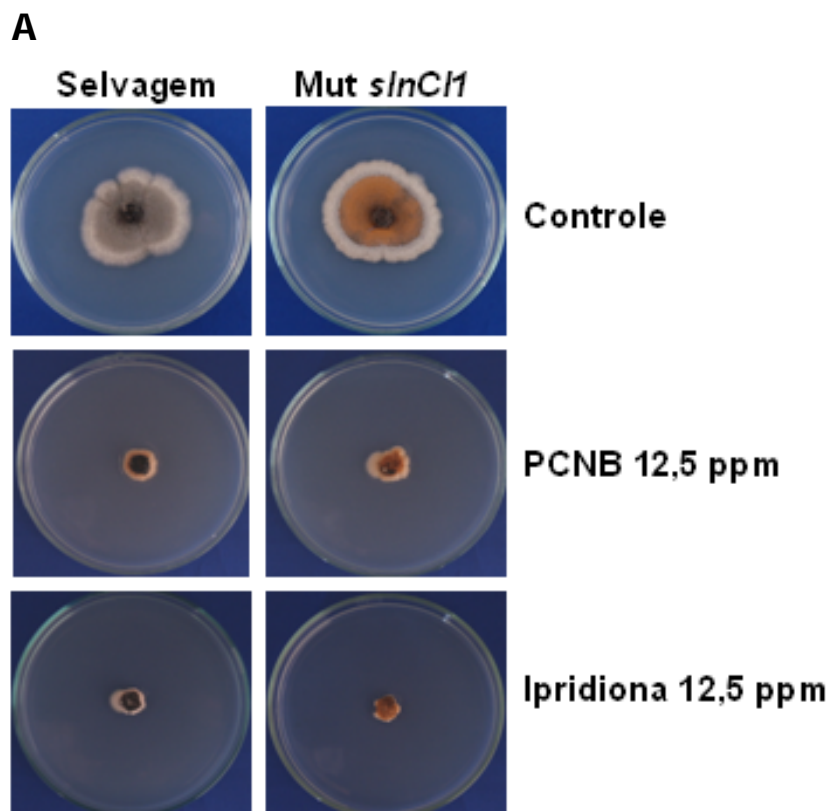


Figura 11: Efeito da inibição do crescimento da linhagem mutante *slnCI1* e do isolado selvagem em meio com fungicida (A) Discos de micélio de 6 mm do isolado selvagem e do mutante foram repicados em meio YGA suplementado com PCNB e Ipridiona 12,5 ppm. As placas foram mantidas a 22 °C, sob 16 h de luz por 12 dias. **(B)** A média do diâmetro de crescimento do micélio em três placas foi utilizada para a construção do gráfico. As linhas sobre as barras mostram o desvio padrão.

5. Discussão

Um fragmento de 362 pares de bases obtido pela recuperação de um gene interrompido no mutante não patogênico LVSa1 foi utilizado como sonda no isolamento completo do gene *slnC11*, a partir do banco genômico de *C. lindemuthianum*. O gene codifica uma proteína de 1184 aminoácidos e apresenta homologia com a classe de histidina quinase Sln1/HHK5 presente em diversos fungos. SlnC11 é uma proteína híbrida, contendo tanto a porção HK com o resíduo de histidina que se autofosforila, quanto a porção RR em um mesmo polipeptídeo. Como demonstrado no alinhamento com sequências de aminoácidos presentes em outros fungos (Figura 4), as regiões H, N, G1, F e G2 são extremamente conservadas, bem como a ordem em que se encontram no genoma, sugerindo a importância dessas regiões para a função da proteína e a sua manutenção durante o processo de evolução. Além disso, pela análise da sequência, SlnC11 é uma histidina quinase transmembrana, possuindo um domínio extracelular responsável por perceber modificações ambientais, tais como variações na concentração osmótica do meio, e auxiliar a adaptação do fungo e a sua sobrevivência as novas condições. De acordo com os resultados obtidos em *C. lindemuthianum*, essa proteína sensora parece ser responsável pela adaptação do fungo a ambientes com alta concentração de açúcar, além de estar envolvida no processo de infecção. A inativação do gene *slnC11* causada pela integração vetor pIS2 gerou um mutante com deficiência parcial na sua capacidade de produzir melanina, porém com crescimento normal em meio de cultura padrão. Outras características desse mutante foram a redução expressiva da capacidade de infectar plantas de um cultivar de feijoeiro susceptível a antracnose e a sensibilidade a altas concentrações de açúcares adicionados ao meio. Tais aspectos são característicos da função de histidinas quinases da classe Sln1 já descritas previamente em fungos (Ostrander et al., 1999; Nagahashi et al., 1998; Santos & Shiozaki, 2001).

Sacharomyces cerevisiae possui somente uma HK no genoma, denominada Sln1p, sendo a sua atividade essencial para o crescimento dessa levedura, inclusive sob baixas concentrações osmóticas, agindo como um sensor para alterações do meio (Maeda et al., 1994). Três fatores (Sln1, Ypd1 e Ssk1) são elementos essenciais na via HOG, a qual é requerida em resposta a alta osmolaridade e adaptação do microrganismo. Sln1 transmite o sinal através do sistema de dois componentes (Sln1-Ypd1-Ssk1) e da cascata MAP kinase (Ssk2/Ssk22-Pbs2-Hog1). A mutação que

modifica tanto o resíduo de histidina em HK quanto o resíduo de ácido aspártico em RR de *S. cerevisiae* faz com que ocorra acúmulo da forma não fosforilada de Ssk1, o que ativa Ssk2 e Ssk22 MAPKKs, estimulando a via HOG constitutivamente, já que Sln1 é seu repressor. Em *S. cerevisiae*, tais mutações foram letais (Maeda et al., 1994). Curiosamente, o mesmo não ocorreu em *C. albicans*. De acordo com Yamada-Okabe et al. (1999), a interrupção de qualquer uma das três HKs de *C. albicans* prejudica a formação da hifa, mas o mutante é viável sob condições osmóticas normais e altas. Porém, sob altas concentrações ele possui em crescimento mais lento. Além disso, ocorreu uma atenuação da virulência desse patógeno quando comparado ao selvagem. Da mesma maneira que em *C. albicans*, pelo fato do mutante *sln1* ser viável, acredita-se que *C. lindemuthianum* possua outras maneiras de controlar a via Hog MAPK, impedindo a sua ativação constitutiva. Isso sugere que *C. lindemuthianum* possua outra histidina quinase ainda não identificada, que esteja compensando, em parte, o efeito do gene *slnCII* inativado.

A diminuição da melanização causada pela interrupção do gene *slnCII* provavelmente tem envolvimento direto com a perda de virulência do mutante de *C. lindemuthianum*. A camada de melanina que envolve o apressório possui um importante papel no processo de patogenicidade de fungos fitopatógenos, pela geração da pressão de turgor, necessária para o processo de infecção e penetração no hospedeiro, como já bem descrito em espécies de *Colletotrichum* e *Magnaporthe* (Veneault-Fourrey et al., 2005). A melanina é essencial para a infecção, não apenas em fitopatógenos. Nemecek et al. (2006) obtiveram um mutante de *Histoplasma capsulatum* com características fenotípicas similares ao mutante *slnCII*. Foi isolado um gene com similaridade a Sln1p de *S. cerevisiae*, e que possuía todas as regiões conservadas, como H e G-boxes, além de regiões transmembrana e RR. Esse gene foi denominado de DRK1 (dimorphism-regulating histidine kinase). Utilizando RNAi para silenciar a expressão desse gene em *H. capsulatum*, foram obtidos transformantes com ausência de melanina, em contraste ao isolado selvagem que apresenta melanização normal. Após inoculação de esporos da linhagem DRK1 silenciada em animais notou-se uma significativa redução da virulência. Entretanto, a perda de melanização não foi relatada por Yamada-Okabe et al. (1999) nos mutantes *sln1* de *C. albicans*, apesar desses sofrerem apenas uma atenuação na virulência. Tal fato sugere que o envolvimento dessa proteína com a produção de melanina pode não ser abrangente a todos os fungos e que *slnCII* pode atuar no

processo de patogenicidade de outras maneiras, além do envolvimento na melanização. Além disso, a função da histidina quinase Sln1 parece variar em diferentes grupos de fungos. Em *A. nidulans*, o gene *tcsB*, análogo de *sln1*, não é essencial para o desenvolvimento e infecção provocada por esse fungo. Mutantes $\Delta tcsB$ não apresentaram fenótipo diferente ao tipo selvagem, em relação a morfologia, osmosensibilidade e virulência.

Para confirmar se o gene *slnCII* é realmente responsável pelo fenótipo do mutante LVSa1 (Santos et al., 2006), foi empregada mutagênese sítio dirigida no isolado A₂ 2-3, pertencente à raça 89. Pelo fato do mutante LVSa1 apresentar uma deficiência parcial na produção de melanina, sabia-se previamente que o mutante obtido pela interrupção desse gene teria o mesmo fenótipo.

O mutante *slnCII* apresentou extrema sensibilidade a presença de manitol, sorbitol, glicose e sacarose 1M, porém não teve mudanças significativas quando exposto a altas concentrações dos sais NaCl, KCl e CaCl₂, sugerindo que o fungo pode distinguir o estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares e de sais. Um fato idêntico foi encontrado no fitopatógeno de arroz *Pyricularia oryzae* (telem. *Magnaporthe grisea*), onde a linhagem mutante $\Delta hik1$ também mostrou aumento na sensibilidade a altas concentrações de açúcares e não em sais (Motoyama et al., 2005). O gene HIK1 pertence a classe III de HKs, grupo ortólogo a classe de Sln1, sugerindo funções semelhantes entre essas histidinas quinases. Já em *N. crassa*, os mutantes *os-1*, também pertencentes a mesma classe que HIK1, são sensíveis tanto a altas concentrações de açúcares quanto de sais. Em fungos filamentosos, duas classes de HKs estão relacionadas com adaptação ao estresse osmótico: grupo III e grupo VI. Para relacionar com outros componentes da mesma via de sinalização de HK e determinar o envolvimento na osmorregulação e patogenicidade, Motoyama et al. (2008) construíram mutantes para os três genes putativos (MoSSK1, MoSKN7 e MoRIM15) que codificam RR em *Magnaporthe oryzae*. As linhagens $\Delta Mossk1$ estudadas mostraram grande sensibilidade a altas concentrações de sorbitol (0,5 e 1 M) e pequena sensibilidade a altas concentrações de KCl (0,5 e 1 M). Em contraste, a osmosensibilidade de linhagens $\Delta Moskn7$ não aumentou. Já as linhagens $\Delta Morim15$ mostraram sensibilidade a KCl em altas concentrações. O número de lesões causadas pelas linhagens $\Delta Mossk1$ e $\Delta Morim15$ em um cultivar susceptível foram significativamente reduzidas quando comparadas com o isolado selvagem. A linhagem $\Delta Morim15$ mostrou redução na melanização da hifa, em contraste com as linhagens $\Delta Mossk1$ e $\Delta Moskn7$ que

mostraram aumento na melanização da hifa. Esses resultados demonstram que todos os componentes da via de sinalização têm importância e envolvimento nos processos fisiológicos de fungos, visto que os mutantes RR apresentaram fenótipos semelhantes a mutantes HK.

A análise de agrupamento feita com a sequência da proteína deduzida SlnC11 colocou-a na classe VI, como esperado, além de conseguir reunir todas as proteínas utilizadas em suas respectivas classes (Figura 5). Muitos dos grupos contém HKs que são altamente conservadas em ascomicetos filamentosos, enquanto outros grupos são mais divergentes. Estes agrupamentos sugerem que algumas HKs são necessárias para as funções básicas compartilhadas por muitos ascomicetos, como osmorregulação, enquanto outros evoluíram para se adaptar a aspectos específicos ao modo de vida do patógeno. Esses grupos utilizados foram determinados por meio de uma extensa análise filogenética feita por Cattlet et al. (2003), o qual revelou que os grupos NIK1, HHK5/SLN1, HHK1 e HHK2 possuem similares em HKs de leveduras. Dessa maneira, o autor sugere um ancestral comum entre eles e que deu origem as respectivas classes de HKs.

Esse foi o primeiro trabalho que identificou e caracterizou uma histidina quinase em *Colletotrichum lindemuthianum*. Devido aos resultados apresentados, espera-se que esse fungo possua outras classes de HKs. Porém, sem uma análise precisa do seu genoma é impossível prever quantas HKs ele possui e quais estão associadas a osmorregulação, a patogenicidade e a resistência a fungicidas. Fungos filamentosos contém um maior número de HKs do que leveduras, como demonstrado pela análise de genomas completos, que possibilitou a identificação de 21 genes que codificam HKs em *C. heterostrophus*, 20 em *B. fuckeliana*, 16 em *G. moniliformis* e 11 em *N. crassa*, sendo todas híbridas, contendo HK e RR no mesmo domínio, e apenas 1 e 3 em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, respectivamente (Cattlet et al., 2003). Esse fato explica o maior número de diferentes nichos que os fungos ocupam e ao qual se adaptaram. Pelo fato da linhagem mutante *slnC11* não ser resistente aos antibióticos testados, acredita-se que eles tiveram como alvo uma outra histidina quinase não caracterizada em *C. lindemuthianum* e que deve apresentar envolvimento com a via HOG MAPK. A linhagem $\Delta hik1$ de *P. oryzae*, bem como mutantes *os-1* de *N. crassa*, ambos da classe III de HKs adquiriram resistência a três tipos de famílias de fungicidas testados: fenilpirroles (fludioxonil e fenpiclonil), dicarboximidas (ipridiona, vinclozolin e

procymidone) e hidrocarbonetos aromáticos (PCNB, tolclofos-metil e cloroneb) (Fujimura et al., 2000; Motoyama et al., 2005). Como ainda não foram encontradas HKs na análise de sequências genômicas de animais e devido a esse sistema de sinalização estar relacionado a diferentes funções em fungos, o sistema de dois componentes pode ser considerado um alvo atrativo para agentes antimicrobianos (Catlett et al., 2003).

Embora bem estudado em bactérias e leveduras, existem poucos trabalhos sobre identificação de sistema de dois componentes em fungos. Até o presente momento, poucos genes que codificam HKs foram caracterizados, e seu papel no processo de infecção de fungos fitopatogênicos ainda não foi claramente elucidado. O estudo de HKs em fungos pode ser de essencial importância para ajudar a compreender o processo de infecção, pelo envolvimento dessa proteína em diversos processos fisiológicos importantes em microrganismos, e devido ao potencial como alvo para o controle do patógeno.

6. Conclusões

O gene *slnC11* foi isolado do banco genômico de *C. lindemuthianum* e completamente sequenciado, codificando uma proteína de 1884 aminoácidos. Foram identificados três íntrons putativos;

A proteína SlnC11 possui todas as regiões conservadas típicas de histidinas quinases, ficando agrupada na classe VI;

A proteína SlnC11 está envolvida na produção de melanina e na patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*;

A sensibilidade do mutante *slnC11* a meios com alta concentração de açúcares demonstra a atuação da proteína SlnC11 na adaptação ao estresse osmótico;

C. lindemuthianum pode distinguir o estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares e de sais;

O mutante *slnC11* não apresentou resistência aos fungicidas PCNB e Ipridiona, que possuem como alvo de ação componentes da via HOG MAPK.

Os resultados apresentados indicam que possivelmente *C. lindemuthianum* possui outra proteína envolvida na osmorregulação, provavelmente uma outra histidina quinase.

7. Referências Bibliográficas

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-02, 1997.
- Alzate-Marin, A.L., Sartorato, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative*, 47:241-242, 2004.
- Araújo, E. Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, MG: UFV, Viçosa, 114p., 1988.
- Bahn, Y., Kojima, K., Cox, G. M., Heitman, J. A Unique Fungal Two-Component System Regulates Stress Responses, Drug Sensitivity, Sexual Development, and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*, 17:3122-3135, 2006.
- Bailey, J.A., Jeger, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, p.388, 1992.
- Bailey, J. A.; O'Connell, R. J.; Pring, R. J.; Nash, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. CAB International, Wallingford, UK, pp 88–120, 1992.
- Benton, W. D., Davis, R. W. Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, 196, 180-183, 1977.
- Bilinska, B. Progress of infrared investigations of melanin structures. *Spectrochimica Acta*, 52, 1157-1162, 1996.
- Blomberg, A., Adler, L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171:1087-1092, 1989.

- Bourret, R. B., Borkovich, K. A., Simon, M. L. Signal transduction pathways involving proteins phosphorylation in prokaryotes. *Annual Review Biochemistry*, 60:401-441, 1991.
- Brown, S. M., Campbell, L. T., Lodge, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current Opinion in Microbiology*, 10:320–325, 2007.
- Camargo Jr., O. A. Identificação de recombinantes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* por meio de marcadores RAPD. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 60p, 2004.
- Casadevall, A.; Rosas, A. L.; Nosanchuk, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 354–358, 2000.
- Catlett, N. L., Yoder, O. C., Turgeon, B. G. Whole-Genome Analysis of Two-Component Signal Transduction Genes in Fungal Pathogens. *Eukaryotic cell*, 2:1151-1161, 2003.
- Chaves, G. La antracnosis. In: Schwartz, H.F.; Gálvez, G.E. (Eds.) Problemas de producción de frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali: CIAT. p.37-53., 1980.
- Clemons, K. V., Miller, T. K., Selitrennikoff, C. P., Stevens, D. A. *fos-1*, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis. *Medical Mycology*, 40:259–262, 2002.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em www.conab.gov.br. Acesso em 22/08/2009.
- Coppin, E., Silar, P. Identification of PaPKS1, a polyketide synthase involved in melanin formation and its use as a genetic tool in *Podospora anserina*. *Mycological research*, 111:901-908, 2007.

- Davide, L. M. C. Comprovação da variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 70p, 2006.
- Deschenes, R. J., Lin, H., Ault, A. D., Fassler, J. S. Antifungal Properties and Target Evaluation of Three Putative Bacterial Histidine Kinase Inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43:1700-1703, 1999.
- Dillard, H. R.; Cobb, A. C. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. *Plant Disease*, 77:1233-1238, 1993.
- Dufresne, M.; Bailey, J. A.; Dron, M.; Langin, T. *clk1*, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11:99-108, 1998.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A. L.; Bailey, J. A.; Langin, T. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Plant Cell*, 12: 1579-1589, 2000.
- Eliahu, N., Igbaria, A., Rose, M. S., Horwitz, B. A., Lev, S. Melanin Biosynthesis in the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus* Depends on Two Mitogen-Activated Protein Kinases, Chk1 and Mps1, and the Transcription Factor Cmr1. *Eukaryotic cell*, 6:421-429, 2007.
- Embrapa Arroz e Feijão, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: [http:// www.cnpaf.embrapa.br](http://www.cnpaf.embrapa.br). Acesso em 22/08/2009.
- Fernández-Luqueño, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Salomón-Hernández, G., Yáñez-Meneses, J., Ceballos-Ramírez, J. M., Dendooven, L. Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Bioresource Technology*, 2009.

- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6):596-605, 1998.
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I. Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science*, 25:31–36, 2000.
- Hamilton, A.J.; Gomez, B.L. Melanins in fungal pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 51: 189–191, 2002.
- Hohmann, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2):300-372, 2002.
- Howard, R. J.; Ferrari, M. A.; Roacht, D. H.; Money, N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Microbiology*, 88: 11281-11284, 1991.
- Howard, R.J., Valent, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review Microbiology*, 50: 491–512, 1996.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96:23-28, 1990.
- Isaac, S. Fungal Plant Interaction. Chapman and Hall Press, London, p.115, 1992.
- Ishikawa, F. H. Variabilidade Genética de isolados da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 62p, 2006.
- Jeng T. L., Shih, Y. J., Lai, C. C., Wu, M. T., Sung, J. M. Anti-oxidative characterisation of NaN_3 -induced common bean mutants. *Food Chemistry*, 2009.

- Jones, C. A., Greer-Phillips, S. E., Borkovich, K. A. The Response Regulator RRG-1 Functions Upstream of a Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Impacting Asexual Development, Female Fertility, Osmotic Stress, and Fungicide Resistance in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell*, 18:2123–2136, 2007.
- Karniol, B., Vierstra, R. D. The HWE Histidine Kinases, a New Family of Bacterial Two-Component Sensor Kinases with Potentially Diverse Roles in Environmental Signaling. *Journal of Bacteriology*, 186(2):445-453, 2004.
- Kimati, H., Galli, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Scherenk. f. sp. *phaseoli*, fase ascógena do agente causal da antracnose no feijoeiro. *Anais da ESALQ, Piracicaba*, 27:411-437, 1970.
- Kinghorn, J. R., Turner, G. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, 1^aed. London, New York: Blackie Academic & Professional, 1992.
- Klein, B. S., Tebbets, B. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 10:314–319, 2007.
- Kubo, Y.; Takano, Y.; Endo, N.; Yasuda, N.; Tajima, S.; Furusawa, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. *Applied Environment Microbiology*, 62: 4340–4344, 1996.
- Kramer, B., Thines, E., Foster, A. J. MAP kinase signalling pathway components and targets conserved between the distantly related plant pathogenic fungi *Mycosphaerella graminicola* and *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 46:667–681, 2009.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. V., Sonnhammer, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov Model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305:567-580, 2001.

- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 143-158, 2003.
- Latunde-Dada, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and break out. *Molecular Plant Pathology*, 2:187–198, 2001.
- Leterme, P., Muñoz, L. C. Factors influencing pulse consumption in Latin America, *British Journal of Nutrition*, 88:251–254, 2002.
- Liu, W., Leroux, P., Fillinger, S. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 45:1062–1074, 2008.
- Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M.A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2-3):205-211, 2006.
- Ma, Z., Michailides, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863, 2005.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369:242 – 245, 1994.
- Maeda, T., Takekawa, M., Saito, H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269:554-558, 1995.
- Medeiros, L. A. M. Resistência genética do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) ao *Colletotrichum lindemuthianum*. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97p, 2004.

- Money, N. P.; Howard, R.J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetic Biology*, 20: 217–227, 1996.
- Montoya, C. A., Gomez, A. S., Lalle's, J. P., Souffrant, W. B., Beebe, S., Leterme, P. In vitro and in vivo protein hydrolysis of beans (*Phaseolus vulgaris*) genetically modified to express different phaseolin types. *Food Chemistry*, 106:1225–1233, 2008.
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., Kudo, T. A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genetics and Biology*, 42:200–212, 2005.
- Motoyama, T., Ochiai, N., Morita, M., Iida, Y., Usami, R., Kudo, T. Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Current Genetics*, 54:185–195, 2008.
- Nagahashi, S., Mia, T., Ono, N. Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., Yamada-Okabe, H. Isolation of *CaSLN7* and *CaNIKI*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology*, 144:425-432, 1998.
- Nemecek, J. C., Wu, M., Klein, B. S. Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. *Science*, 312, 2006.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:7850-7854, 1986.
- Nosanchuk, J. D., Casadevall, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis: microreview, *Cellular Microbiology*, 5 (4):203–223, 2003.

- O'Connell, R. J.; Bailey, J. A.; Richmond, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiology Plant Pathology*, 27: 75–98, 1985.
- Ostrander, D. B., Gorman, J. A. The Extracellular Domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p Membrane Osmolarity Sensor Is Necessary for Kinase Activity. *Journal of Bacteriology*, 181(8): 2527-2534, 1999.
- Parisot, D.; Dufresne, E. M.; Veneault, E. C.; Lauge, A. R.; Langin, T. *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetic Genomics*, 268: 139–151, 2002.
- Peloso, M. J. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais-Brasil. In: Pastor-corrales, M. A. La antracnosis del frijól comum, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Cali: CIAT, 113:86-108, 1992.
- Perfect, J. R.; Wong, B.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J.; Williamson, P. R.; *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. *Medical Mycology*, 36: 79–86, 1998.
- Perfect, S. E.; Hughes, H. B.; O'Connell, R. J.; Green, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. *Fungal Genetic Biology*, 27:186–198, 1999.
- Perpetua, N. S.; Kubo, Y.; Yasuda, N.; Takano, Y.; Furusawa, I. Cloning and characterization of a melanin biosynthetic THR1 reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular Plant Microbe Interact*, 9: 323– 329, 1996.
- Poggeler, S., Masloff, S., Hoff, B., Mayrhofer, S., Kuck, U. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi, *Current Genetics*, 43:54-61, 2003.

- Pria, M. D.; Silva, O. C.; Costa, J. L. S.; Souza, E. D. T.; Berni, R. F. Diagnose das doenças. In: Canteri, M. G.; Pria, M. D.; Silva, O. C. (eds) Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa, PR: Editora UEPG, 17-34p, 1999.
- Pria, M.D.; Amorim, L.; Filho, A.B. Quantification of monocyclic components of the common bean anthracnose. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 2003.
- Riley, P.A. Melanin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 29: 1235-1239, 1997.
- Roca, M. M. G. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenck f. sp. Phaseoli (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sac & Man) Scriber). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 82p, 1997.
- Rodriguez-Guerra, R., Ramirez-Rueda, M.T., Veja, M. L., Simpson, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from México. *Plant Pathology*, 52:228-235, 2003.
- Román, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., Pla, J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in Microbiology*, 15(4), 2007.
- Ross, K. A., Beta, T., Arntfield, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113:336–344, 2009.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Molecular Biology*, 132:365-386, 2000.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

- Sanger, F.; Nicklen, S. E.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74:5463-5467, 1977.
- Santos, J. L., Shiozaki, K. Fungal Histidine Kinases. *Science STKE*, 98, 2001.
- Santos, L. V.; Araújo, E. F.; Queiroz, M. V. Isolamento e caracterização de um mutante albino e não patogênico de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), Anais do XVI Simpósio de Iniciação Científica, VI Mostra da Pós – Graduação e IV Simpósio de Extensão Universitária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 2006.
- Santos, L. V. Caracterização de um mutante albino de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), obtido por REMI (Integração Mediada por Enzima de Restrição). Monografia em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 49p, 2007.
- Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., Dolan, K. D. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food Science and Technology*, 1–6, 2009.
- Soares, M. A. Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (2007) 210p.
- Souza, B. O., Souza, E. A., Mendes-Costa, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, 31:1000-1006, 2007.
- Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503-517, 1975.

- Stock, A. M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. Two-component signal transduction. *Annual Review Biochemistry*, 69:183-215, 2000.
- Sutton, B. C. The genus *Glomerella* and Anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: CAB International/British Society for Plant Pathology, 388p, 1992.
- Spetch, C. A., Dirusso, C. C., Novotny, C. P., Ullach, R. C. A method for extracting high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochemistry*, 119:158-163, 1982.
- Swofford, D. L. *Phylogenetics analysis using parsimony (and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, 2002.
- Szeto, C. Y. Y., Wong, Q. W. L., Leung, G. S., Kwan, H. S. Isolation and transcript analysis of two-component histidine kinase gene *Le.nik1* in Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. *Mycological research*, 112:108-116, 2008.
- Taborda, C. P., Silva, M. B., Nosanchuk, J. D., Travassos, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, 165:331–339, 2008.
- Takano, Y.; Kubo, Y.; Shimizu, K.; Mise, K.; Okuno, T.; Furusawa, I. Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular and General Genetics*, 249:162–167, 1995.
- Tamura, K., Dudley J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*, 24:1596-1599, 2007.
- Thines, E.; Weber, R. W. S.; Talbot, N. J. MAP Kinase and Protein Kinase A–Dependent Mobilization of Triacylglycerol and Glycogen during Appressorium Turgor Generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 12: 1703–1718, 2000.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-80, 1994.
- Tsuji, G.; Fujijawa, J.; Ishida, H.; Horino, O.; Kubo, Y. Laccase Gene *LAC1* of *Colletotrichum lagenarium* is not essential for melanin biosynthesis and pathogenicity *Journal of General Plant Pathology*, 67: 182-190, 2001.
- Veneault-Fourrey, C.; Laugé, R.; Langin, T. Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4761–4770, 2005.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31:3688-91, 2003.
- Vieira, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: Editora – UFV, Brasil, 1983.
- Vieira, C., Júnior, T. J. P.; Borém, A. Feijão, 2nd edn. Viçosa: Editora – UFV, Brasil, 2006.
- Wang, N., Hatcher, D.W., Tyler, R.T., Toews, R., Gawalko, E.J. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 2009.
- White, D. The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. Second Edition, Oxford University Press, New York, 2000.
- Wolanin, P. M., Thomason, P. A., Stock, J. B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10):3013.1–3013.8, 2002.
- Xu, B. J., Chang, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72:159–166, 2007.

- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 181:7243–7247, 1999.
- Zaumeyer, W. J., Thomas, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A., 868, 255p, 1957.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., Xu, J. R. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied Environment Microbiology*, 68:532–538, 2002.

8. Material suplementar

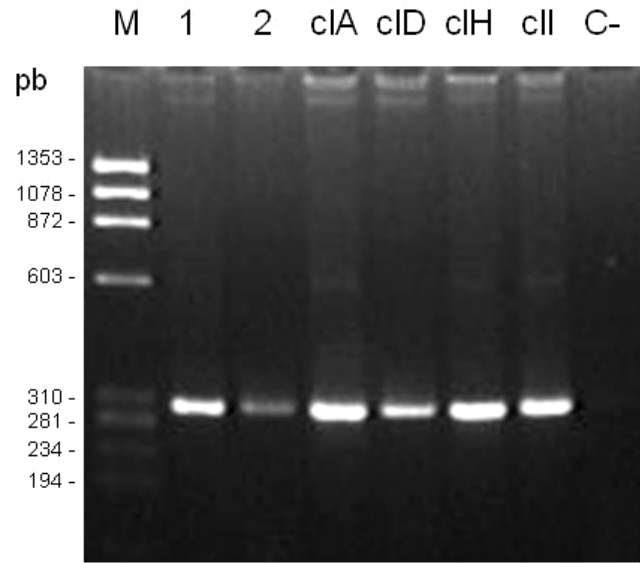


Figura S1: Reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos alb1F e alb1R para verificar se os fagos isolados cIA, cID, cIH e cII carregam o gene de interesse ou parte dele. (M) Marcador de tamanho ϕ X174/*Hae*III. Como controle positivo foi utilizado: (1) plasmídeo pRescue24; (2) DNA do isolado A₂ 2-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum*.

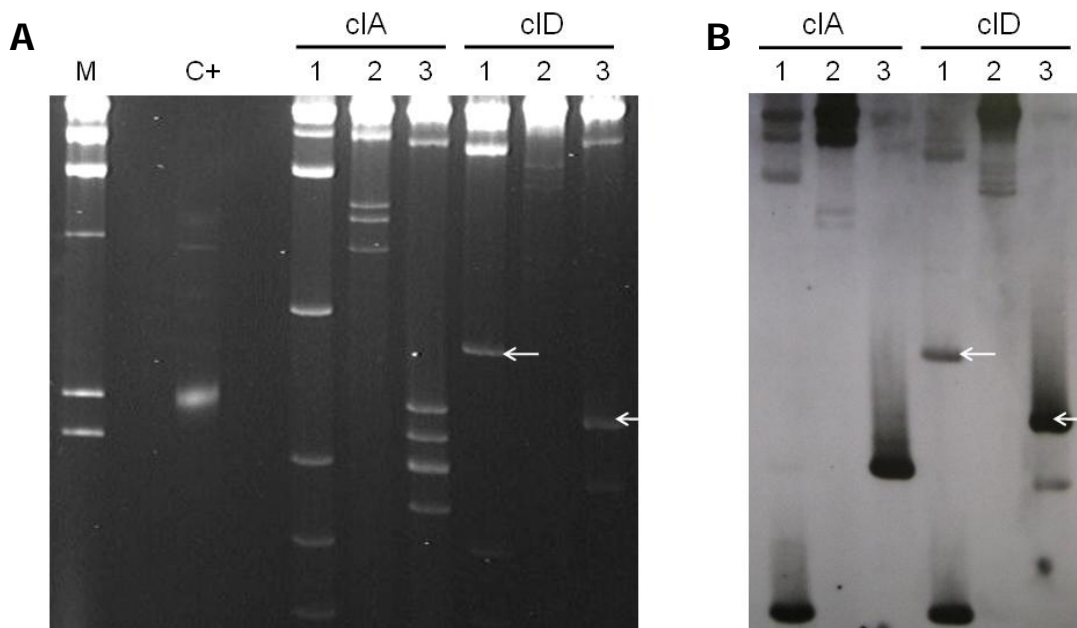


Figura S2: Triagem do gene *slnCII* do banco genômico de *C. lindemuthianum*. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da clivagem do DNA dos fagos positivos cIA e cID. (M) DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III; (C+) plasmídeo pRescue24 usado como controle positivo (1) digestão com a enzima *Kpn*I; (2) digestão com a enzima *Hind*III; (3) digestão com a enzima *Sal*I. **(B)** Auto-radiografia da hibridização de DNA dos fagos positivos isolados. As setas brancas indicam as bandas que foram recuperadas e clonadas.

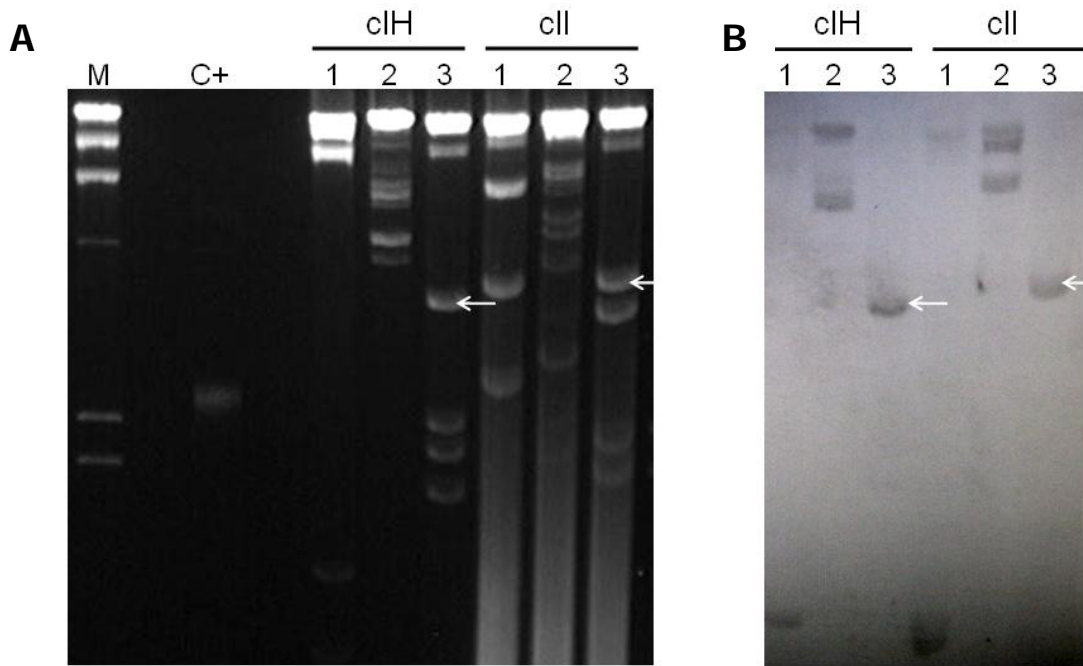


Figura S3: Triagem do gene *slnCII* do banco genômico de *C. lindemuthianum*. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da clivagem do DNA dos fagos positivos cIH e cII. (M) DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III; (C+) plasmídeo pRescue24 usado como controle positivo (1) digestão com a enzima *Kpn*I; (2) digestão com a enzima *Hind*III; (3) digestão com a enzima *Sal*I. (B) Auto-radiografia da hibridização de DNA dos fagos positivos isolados. As setas brancas indicam as bandas que foram recuperadas e clonadas.

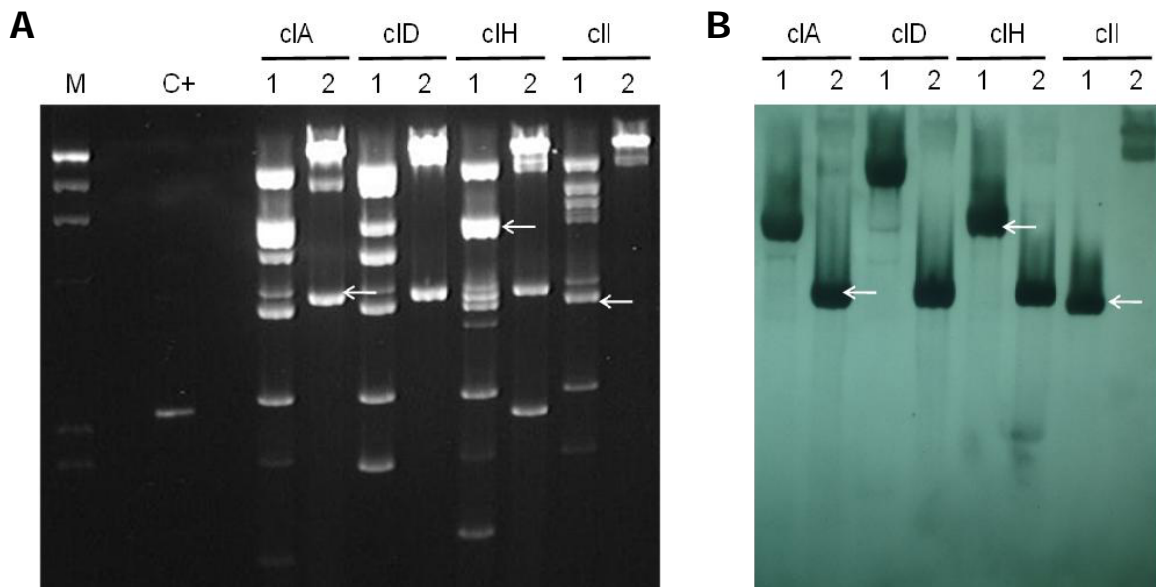


Figura S4: Triagem do gene *slnCII* do banco genômico de *C. lindemuthianum*. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da clivagem do DNA dos fagos positivos clA, clD, cIH e cII. (M) DNA do fago lambda clivado com a enzima *Hind* III; (C+) plasmídeo pRescue24 usado como controle positivo (1) digestão com a enzima *Cla* I; (2) digestão com a enzima *Not*I. (B) Auto-radiografia da hibridização de DNA dos fagos positivos isolados. As setas brancas indicam as bandas que foram recuperadas e clonadas.