

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENE *pacCl*, QUE  
CODIFICA O REGULADOR TRANSCRICIONAL DE RESPOSTA AO pH, DE  
*Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO**

Guilherme Bicalho Nogueira

*Magister Scientiae*

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009**

Ficha catalográfica preparada pela Secção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

N778c  
2009

Nogueira, Guilherme Bicalho, 1984-

Caracterização estrutural e funcional do gene *pacCl* que codifica o regulador transcricional de resposta ao pH, de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro / Guilherme Bicalho Nogueira – Viçosa, MG, 2009.

x, 58f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marisa Viera de Queiroz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-58

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Feijão – Doenças e pragas.
  3. *Colletotrichum lindemuthianum*. 4. Antracnose.
  5. Genética molecular I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22.ed. 576.5

**GUILHERME BICALHO NOGUEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENE *pacCl*, QUE  
CODIFICA O REGULADOR TRANSCRICIONAL DE RESPOSTA AO pH, DE  
*Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO**

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**

**GUILHERME BICALHO NOGUEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENE *pacCl*, QUE  
CODIFICA O REGULADOR TRANSCRICIONAL DE RESPOSTA AO pH, DE  
*Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO**

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: 18 de fevereiro de 2009

---

Prof<sup>ª</sup> Denise Mara Soares Bazzoli

(Co-orientadora)

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel

---

Prof. Maurício Dutra Costa

---

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

---

Prof<sup>ª</sup> Marisa Vieira de Queiroz

(Orientadora)

**“Os homens de experimentações são como as formigas, apenas reúnem e usam; os argumentadores são como as aranhas, constroem teias com sua própria substância. A abelha, porém, segue um caminho intermediário: retira a matéria das flores do jardim e do campo e a digere e transforma com seu próprio poder.”**

*Francis Bacon*

*Aos meus pais, Milton e Rita,  
aos meus irmãos, Marcelo e Flávia,  
e aos meus sobrinhos, Vitor e Igor,  
pelo apoio incondicional,  
dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida e por ter me proporcionado uma oportunidade tão especial como esta. Deste-me sabedoria para aprender e discernir, alegria e entusiasmo para transmitir aos que estavam ao meu lado, coragem para a luta e perseverança para vencer. Obrigado, por ser quem sou e, por hoje, estar onde estou.

Aos meus pais, Milton e Rita, pelo amor, pelo carinho e pelo apoio constantes, os quais foram fundamentais na conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Flávia e Marcelo, meus sobrinhos, Vitor e Igor, por darem um sentido maior à nossa família.

À Universidade Federal de Viçosa e especialmente ao Departamento de Microbiologia, pela excelente oportunidade de formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, imprescindível à realização deste trabalho.

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

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pela excelente oportunidade de formação e pela criação de uma identidade profissional.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela orientação firme e segura, pelo incentivo constante e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pelo carinho, pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho e pelo exemplo de vida.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela amizade, pelos conselhos e pelo exemplo de competência e dedicação.

Aos professores Antônio Galvão do Nascimento, Maurício Dutra Costa e Sérgio Hermínio Brommonschenkel, por aceitarem com prontidão o meu convite.

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

A todos os amigos de Viçosa, pelos eternos momentos vividos nesses sete anos que se passaram e que tempo algum será capaz de nos fazer esquecer.

A todos os amigos da BIO/02, pelo bom convívio, apoio e companheirismo durante a graduação.

Às amigas de graduação Jussara, Isabela, Taline, Bruna, Marliane, Fernanda, Míriam, Priscila, Fabíola e Juliana, que se fizeram presentes desde o início do curso e com as quais eu passei momentos inesquecíveis.

Aos amigos que já passaram pelo Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos e que serão pra sempre lembrados: Ronney, Lara, Ana Karina, Gilvan, Darlene, Júnio, Tatiana, Rafael, Marina, Swiany, Felipe e Daniel. Especialmente aos amigos Ronney e Gilvan, que me permitiram dar os primeiros passos no laboratório, contribuindo significativamente para a minha inserção no mundo científico.

Aos amigos que trabalham no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos Leandro Vieira, Mateus, Tiago, Maycon, Mayka, Klédna, Rafael, Jaqueline, Mariana, Irene, Janaína, Leonardo, Mariane, Leandro Lira, Ana Angélica, Fábio, Andrea, Francisco, Carolina e Rodrigo, pela boa convivência e pelos divertidos momentos de descontração no cafezinho.

Especialmente às gurias tri-legais, Ana Paula e Juline, por compartilharmos desde o primeiro momento todas as alegrias, tristezas, vitórias e expectativas, pelas longas conversas, pelas brincadeiras e por todos os momentos inesquecíveis.

Aos amigos que, mesmo não fazendo parte do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, foram e sempre serão muito bem recebidos no nosso Laboratório, Maria Emilene, Janaína e Ana Andrea.

Aos meus amigos-irmãos, Alexandra e Thiago, por tudo que nós construímos durante esses anos de convivência, e que nem mesmo o tempo ou a distância será capaz de desfazer. Pelas conversas intermináveis, pelos dias, noites e madrugadas de estudo inesgotáveis, pelas gargalhadas incontroláveis, por tudo o que fizemos e ainda faremos, por tudo o que nos prometemos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia, Micorrizas, Petróleo, Café, Anaeróbios, Microbiologia de Alimentos e Industrial, Talitinha, Júlio, Rafael Hermano, Aline Jaime, Laélia, Eliana, Alessandra, Andressa, Aline Paiva, Hélon, Marcelo e Adriana.

Aos amigos e familiares de Ubá, os quais sempre se fizeram presentes.

À 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**

GUIHERME BICALHO NOGUEIRA, filho de Milton Alves Nogueira e Rita de Cássia Bicalho Nogueira, nasceu em 16 de fevereiro de 1984, em Ubá, Minas Gerais.

Em maio de 2002, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se bacharel e licenciado no curso de Ciências Biológicas, no dia 16 de março de 2007.

Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 18 de fevereiro de 2009.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1- O feijão-comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.): origem, características gerais e o seu impacto na economia .....	2
2.2- <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e a antracnose do feijoeiro .....	3
2.3- Genes de patogenicidade na interação planta-patógeno .....	8
2.4- O fator de transcrição PacC e a regulação da expressão gênica pelo pH ambiental .....	10
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1- Microrganismos e condições de cultivo.....	19
3.2- Isolamento do gene <i>pacCl</i> a partir do Banco Genômico de <i>C. lindemuthianum</i> .....	19
3.3- Subclonagem do gene <i>pacCl</i> .....	20
3.4- Sequenciamento do gene <i>pacCl</i> .....	20
3.5- Análise filogenética do gene <i>pacCl</i> .....	22
3.6- Determinação do número de cópias do gene <i>pacCl</i> , e caracterização molecular do mutante <i>pacCl</i> (Mutpac2) .....	23
3.6.1- Obtenção de massa micelial.....	23
3.6.2- Extração de DNA total.....	23
3.6.3- Hibridização de DNA .....	24
3.7- Análise da expressão do gene <i>pacCl</i> por PCR Quantitativo, durante a cinética de infecção .....	25
3.7.1- Obtenção de conídios e condições de inoculação .....	25
3.7.2- Extração de RNA total.....	25
3.7.3- Síntese de cDNA e PCR Quantitativo em tempo real .....	26
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1- Isolamento e clonagem do gene <i>pacCl</i> .....	28
4.2- Sequenciamento e caracterização do gene <i>pacCl</i> .....	29
4.3- Determinação do número de cópias do gene <i>pacCl</i> , e caracterização molecular do mutante <i>pacCl</i> (Mutpac2) .....	42

4.4- Análise da expressão do gene <i>pacCl</i> por PCR Quantitativo em tempo real, durante a cinética de infecção .....	44
5- CONCLUSÕES .....	49
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## RESUMO

NOGUEIRA, Guilherme Bicalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Caracterização estrutural e funcional do gene *pacCl*, que codifica o regulador transcricional de resposta ao pH, de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Elza Fernandes de Araújo

*Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose, uma das doenças mais severas que acometem a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Desde o contato inicial até o estabelecimento dos sintomas da doença, *C. lindemuthianum* regula a expressão diferencial de genes essenciais para a patogenicidade que vão possibilitar a colonização do tecido hospedeiro e a finalização do seu ciclo de infecção. Nesse trabalho, o gene *pacCl*, que codifica o regulador transcricional de resposta ao pH ambiental, foi isolado e caracterizado estrutural e funcionalmente. Uma sequência de 2.546 pb foi isolada do banco genômico de *C. lindemuthianum*, correspondente ao gene *pacCl*. Esta sequência apresenta uma ORF de 1.746 pb, codificando, portanto, uma proteína de 581 resíduos de aminoácidos. Foram identificados na sequência, três íntrons putativos, contendo 60, 58 e 74 pb, cada um deles. O alinhamento múltiplo da sequência deduzida da proteína, com as sequências disponíveis nos bancos de dados, demonstrou elevado grau de identidade e similaridade da proteína identificada com o regulador transcricional PacC/Him101 de fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. Além disso, a proteína PacCl se mostrou eficiente como marcador filogenético em fungos, pois agrupou de forma coerente os organismos taxonomicamente relacionados. A hibridização de DNA usando o gene *pacCl* como sonda, mostrou que o gene encontra-se em uma única cópia no genoma de *C. lindemuthianum*. Do mesmo modo, a análise do mutante Mutpac2 por hibridização de DNA, confirmou que o gene *pacCl* havia sido inativado por um evento de recombinação homóloga do tipo troca gênica. Por fim, a técnica de PCR quantitativo em tempo real mostrou que o gene *pacCl* é expresso em todas as fases do ciclo de infecção, porém, os maiores níveis foram encontrados no final da fase necrotrófica. Pode-se sugerir que um dos fatores responsáveis por esse aumento, seja a alcalinização do tecido vegetal, decorrente do envelhecimento do tecido, e/ou até mesmo da própria atividade do fungo, que em muitos casos secreta substâncias alcalinizantes, como por exemplo, amônia.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Guilherme Bicalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Structural and functional characterization of the *pacCl* gene codifying the transcriptional regulator of the response to pH in the *Colletotrichum lindemuthianum* that is the causal agent of anthracnose in the bean plant.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Elza Fernandes de Araújo

*Colletotrichum lindemuthianum* is the causal agent of anthracnose, that is one of the most severe diseases occurring in the crop of the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). From the initial contact to the establishment of the symptoms of the disease, *C. lindemuthianum* regulates the differential expression of the genes that are essential to the pathogenicity and will make possible the colonization of the host tissue and the conclusion of its infection cycle. In this study, the *pacCl* gene codifying the transcriptional regulator of the response to the environmental pH was isolated and structurally and functionally characterized. A 2.546 pb sequence was isolated from the genomic bank of *C. lindemuthianum*, corresponding to the gene *pacCl*. This sequence shows an ORF with 1.746 pb, therefore codifying a protein containing 581 residues of amino acids. In the sequence, three putative introns containing 60, 58 and 74 pb each one were identified. The multiple alignment of the protein-deduced sequence with the sequences available in the data file showed both high identity level and similarity of the protein identified with the PacC/Him101 transcriptional regulator of filamentous fungus and yeasts, respectively. In addition, the PacCl protein was shown to be efficient as a phylogenetic marker in fungus, since it coherently grouped those taxonomically related organisms. The DNA hybridization by using the *pacCl* gene as probe showed the gene is found in one single copy in the genome of *C. lindemuthianum*. In the same way, the mutant Mutpac2 analysis by hybridization of DNA corroborated the gene *pacCl* was inactivated by an event of the genic exchange-type homologous recombination. Finally, the quantitative PCR technique in real time showed the *pacCl* gene to be expressed in all phases of the infection cycle, but the highest levels were found at the end of the necrotrophic phase. It can be suggested that one of the factors responsible for this increase to be the alkalization of the vegetal tissue due to the aging of the tissue and/or even from the activity of the fungus, since in many cases it secretes some alkalizing substances such as the ammonia.

## 1- INTRODUÇÃO

O feijão-comum é uma das culturas anuais de maior importância social e econômica no Brasil. Dentre os fatores que afetam a produtividade e a qualidade dos grãos, a ocorrência de patógenos é o que mais se destaca. O fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é um dos patógenos com maior ocorrência e que causa danos expressivos à cultura do feijão-comum. Para que novas estratégias de combate possam ser estruturadas, é imprescindível o conhecimento básico dos mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos com a variabilidade genética deste fungo, bem como dos processos envolvidos na interação planta/patógeno, desde o contato inicial até o estabelecimento da doença.

O pH do ambiente é um importante controlador da patogenicidade de alguns fungos, regulando a expressão diferencial de genes necessários às diferentes etapas do processo de infecção. As proteínas codificadas por estes genes são potenciais candidatos a fatores de patogenicidade, e hoje, diversas técnicas têm possibilitado determinar eficientemente a contribuição dos mesmos na cinética de infecção.

Nesse contexto, o gene *pacC/HIM101*, constitui um importante alvo para estudos, pois codifica um fator de transcrição que regula a resposta adaptativa dos fungos às variações do pH ambiental. Esse processo ocorre ativamente em muitos fungos e já foi bem caracterizado em *Aspergillus nidulans*. Nesse fungo, a resposta é desencadeada por uma cascata de sinalização intracelular e o funcionamento geral desse sistema requer a expressão e integridade de sete genes (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall*), incluindo entre eles, o gene *pacC* que é o regulador central.

A compreensão do funcionamento geral do sistema PacC no fungo *C. lindemuthianum* pode oferecer importantes conclusões sobre o estabelecimento do processo infeccioso no feijoeiro, o que futuramente pode ser útil na reestruturação ou até mesmo na elaboração de novos e eficientes métodos de combate à doença. Este trabalho relata o isolamento e a caracterização estrutural e funcional do gene *pacC1* do fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.): origem, características gerais e o seu impacto na economia

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus*. Historicamente, o feijão está entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. O feijão foi cultivado no antigo Egito e na Grécia, sendo, também, cultuado como símbolo da vida. Foram encontradas referências ao feijão na Idade do Bronze, na Suíça, e entre os hebraicos, cerca de 1.000 a.C. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que o feijão era o prato favorito dos guerreiros troianos. A maioria dos historiadores atribui a disseminação do feijão no mundo à ocorrência de guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2009).

Hoje, o feijão constitui importante fonte protéica na dieta de enorme parcela da população mundial, em especial nos países onde o consumo de proteína animal é limitado por razões econômicas ou religiosas e culturais. No Brasil é a principal leguminosa fornecedora de proteínas, carboidratos e ferro, fazendo parte da dieta das classes sócio-econômicas menos favorecidas (VIEIRA et al., 2006).

Além de sua relevância na dieta do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, em razão de ser cultivado em grandes áreas e da mão-de-obra necessária durante o ciclo da cultura. O feijão-comum é considerado por muitos o mais importante por ser a espécie cultivada mais antiga e também a mais utilizada nos cinco continentes (VIEIRA et al., 2006).

O feijão-comum é cultivado em mais de 100 países, porém 63% da produção mundial é obtida em apenas cinco, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor. Apenas 8% a 10% da produção mundial destina-se à exportação. Não obstante o grande volume de produção nacional, o Brasil é importador desse produto. A quantidade importada varia em função dos resultados das safras. Nos últimos anos foram importadas, em média, cerca de 100 mil toneladas do grão (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2009).

Dados de Janeiro de 2009, lançados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), mostram que a produção nacional de feijão vem aumentando nos últimos anos, sendo que o último Levantamento Sistemático de Produção Agrícola, referente à safra 2008/2009, relata a produção nacional de 3,592 milhões de toneladas, o que representa uma variação de + 2.0% em relação à safra 2007/2008. O estado de Minas Gerais destaca-se como o segundo maior estado produtor, atingindo no mesmo ano uma colheita de 590.600 toneladas do grão, ficando atrás somente do estado do Paraná, cuja produção atingiu 772.000 toneladas (CONAB, 2009).

Por outro lado, o Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2008/2009 relata uma variação negativa de 1,2% na produtividade (em kg/ha), quando se compara com a produtividade alcançada na safra 2007/2008 (CONAB/IBGE, 2009). Acredita-se que as doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro ainda constituam uma das principais causas dessa queda na produtividade da cultura no Brasil. Estas doenças podem ser de origem fúngica, bacteriana, virótica ou até mesmo causadas por nematóides. Entre as principais doenças fúngicas encontram-se a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), o oídio (*Erysiphe polygoni*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), as podridões radiculares de *Fusarium* e *Rhizoctonia*, a murcha de *Fusarium*, a podridão do colo (*Sclerotium rolfsii*) e, mais recentemente, o carvão (*Microbotryum phaseoli*) e a sarna (*Colletotrichum dematium*). Muitas delas podem causar, dependendo das condições climáticas, redução significativa da produtividade ou, ao mesmo tempo, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Diante dessa realidade e com a economia globalizada, exige-se que os países produtores de feijão sejam mais competitivos com maior ganho de produtividade, redução de custos e aumento da qualidade do produto. O acesso à tecnologia gerada ou adaptada por organizações públicas e privadas e a agregação de valor aos produtos são objetivos que devem ser alcançados. Ao mesmo tempo em que inovações tecnológicas têm sido cada vez mais utilizadas, desafios têm surgido, principalmente com relação à estruturação de novos e eficientes métodos de controle dessas doenças causadas por microrganismos (VIEIRA et al., 2006).

## **2.2- *Colletotrichum lindemuthianum* e a antracnose do feijoeiro**

O termo “antracnose”, derivado de uma palavra grega que significa “carvão”, é o nome comum para doenças que ocorrem em plantas e que se caracterizam pela formação de lesões deprimidas escuras contendo esporos, sobre o tecido vegetal. Na

maioria dos casos, a antracnose é causada por espécies de *Colletotrichum*, as quais pertencem ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Sordariomycetes; Ordem Phyllachorales e Família Phyllachoraceae (BAYLEY & JEGER, 1992).

*Colletotrichum* é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos, sendo amplamente distribuídos pelo mundo, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e sub-tropicais da América Latina, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento da doença. O gênero pertence ao grupo dos Ascomicetos, o qual contém várias espécies capazes de causar a antracnose em uma grande variedade de culturas e plantas ornamentais. Muitas dessas espécies têm sido utilizadas como modelos para estudos de diferenciação e interação planta-patógeno (BAYLEY & JEGER, 1992).

A antracnose, causada pelo fungo *C. lindemuthianum*, apresenta ampla distribuição no Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste e em áreas serranas como as da região sul de Minas Gerais (SILVA, 2004; DAMASCENO et al., 2007; BONETT et al., 2008). Nessas regiões, a ocorrência freqüente de temperaturas moderadas, aliadas à alta umidade, favorecem o desenvolvimento da doença. As perdas causadas pela antracnose são mais severas quando a doença ocorre no início da cultura. Se as condições ambientais forem favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, as perdas podem chegar a 100%, além de provocar a depreciação da qualidade dos grãos (VIEIRA, 1988; PRIA, 1999).

Os sintomas da antracnose são visualizados em todas as partes da planta. Nas folhas, as lesões de antracnose estabelecem-se preferencialmente sobre as nervuras da face inferior e dos pecíolos, causando maceração dos tecidos, devido à destruição da integridade estrutural da lamela média (SCHWARTZ, 1991). Com o colapso do sistema de feixes vasculares nas nervuras e pecíolos das folhas infectadas, ocorre uma descontinuidade do fluxo normal de água e fotoassimilados para as diversas regiões da folha. A redução da translocação de fotoassimilados resulta no acúmulo de carboidratos que, por sua vez, causa diminuição da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>. Quando a doença afeta plântulas, observam-se lesões pequenas de coloração marrom ou preta nos cotilédones. O hipocótilo pode apresentar lesões alongadas, superficiais ou deprimidas, podendo ocorrer o estrangulamento do hipocótilo e morte da plântula. Lesões produzidas no caule e nos pecíolos são alongadas, escuras e às vezes deprimidas. No centro das lesões pode aparecer uma massa de coloração rósea ocasionada pela produção de esporos do fungo. Nas vagens, onde os sintomas são mais típicos e fáceis

de serem observados, ocorrem lesões arredondadas, de coloração escura, deprimidas e de tamanho variável. Algumas vagens podem chegar a murchar e secar (BAYLEY & JEGER, 1992).

As condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno da antracnose são as temperaturas moderadas, entre 13°C e 26°C, associadas à alta umidade relativa do ar (Umidade relativa superior a 92% é requerida durante a germinação de conídios, incubação e subsequente esporulação). Chuvas moderadas em intervalos frequentes, particularmente se forem acompanhadas de ventos, são essenciais para a disseminação local de conídios e desenvolvimento de epidemias severas. O patógeno sobrevive em restos de cultura e no interior das sementes, o que possibilita sua disseminação de um plantio para outro e para longas distâncias. Nestas condições ambientais e sobre cultivares suscetíveis, semeados com sementes infectadas, pode causar redução de até 100% no rendimento da cultura (VIEIRA, 1988).

A utilização de sementes saudáveis e tratadas com fungicidas é uma estratégia importante e eficiente para o controle da antracnose. Contudo, a forma mais econômica de controle dessa doença é a utilização de cultivares resistentes, razão pela qual os programas de melhoramento do feijão têm como um de seus principais objetivos a obtenção de cultivares resistentes ao *C. lindemuthianum*. De acordo com RODRIGUEZ-GUERRA et al. (2003), o desenvolvimento bem sucedido de cultivares resistentes à antracnose depende de um entendimento dos níveis de variabilidade dentro de uma mesma população, bem como entre as diferentes populações do patógeno. Contudo, a notória variabilidade genética presente nesta espécie ainda é um fator limitante à utilização desta estratégia, justificando a necessidade de estudos que busquem compreender os fatores genéticos e mecanismos biológicos que conferem essa enorme variabilidade a esse importante fitopatógeno.

A espécie *C. lindemuthianum*, causadora da antracnose do feijoeiro, apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita e outra sexuada ou perfeita (RAVA et al., 1994).

Na fase assexuada, *C. lindemuthianum* produz conídios numa estrutura especializada de infecção denominada acérvulo (BAYLEY & JEGER, 1992). As hifas no micélio apresentam-se septadas e ramificadas, com coloração variando de hialina à quase negra. Os conídios são hialinos, unicelulares, podendo ser oblongos ou circulares. Em condições favoráveis a ocorrência da doença, a esporulação é abundante, formando uma massa de conídios de coloração róseo-alaranjada. Seguindo a germinação, um

conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos ou continuar crescendo, levando a formação de hifas e micélio (CHAVES, 1980).

Os conídios, quando em condições favoráveis, germinam seis a nove horas após o contato inicial com o hospedeiro. Durante o processo infectivo, o conídio adere à cutícula e germina formando inicialmente o tubo germinativo e em seguida o apressório, o qual, subseqüentemente, penetra mecanicamente pela cutícula e epiderme do tecido vegetal. O aparecimento de sintomas pode ser observado a partir do quarto dia após o início da infecção (KIMATI et al., 1970).

Durante a colonização de seu hospedeiro nessa fase assexuada, *C. lindemuthianum* exibe dois diferentes modos de nutrição, caracterizando duas fases distintas: uma fase biotrófica, na qual os nutrientes são obtidos a partir do crescimento no tecido ainda vivo do hospedeiro, por meio do desenvolvimento de estruturas especializadas de infecção, como o apressório, as vesículas e as hifas primárias; e uma fase necrotrófica, na qual hifas secundárias penetram no tecido hospedeiro entre e/ou dentro das células, permitindo a obtenção de nutrientes essenciais e caracterizando a necrose tecidual típica da doença. Por este motivo, *C. lindemuthianum* é considerado como hemibiotrófico (PERFECT et al., 1999).

Durante a primeira fase (biotrófica), a membrana plasmática e o protoplasma da célula vegetal se expandem em torno da vesícula infectiva e da hifa primária produzida pelo fungo, e uma camada matricial interfacial é depositada entre a parede celular do fungo e a membrana plasmática do hospedeiro. Essa matriz é composta de polissacarídeos e glicoconjugados contendo grupamentos hidroxila. Após aproximadamente 24 horas de penetração, a membrana plasmática do hospedeiro perde a integridade das funções, degenera e morre. As hifas intracelulares começam a absorver os nutrientes das células mortas, iniciando assim a segunda fase do ciclo de infecção: a fase necrotrófica. No início desta fase, as células vegetais morrem, mas ainda não há indução dos mecanismos de defesa. Alguns sintomas macroscópicos começam a se tornar visíveis, como por exemplo, o surgimento de manchas necróticas amarronzadas. No decorrer do processo de infecção, as hifas secundárias atuam colonizando o tecido intra- e intercelular, as paredes celulares do hospedeiro são degradadas sob a ação de enzimas depolimerizadoras, matando mais rapidamente as células e potencializando a fase necrotrófica típica da doença (O'CONNELL et al., 2000).

SHEAR & WOOD (1913) foram os primeiros a descrever a fase sexuada ou perfeita desse fungo (encontrada somente em condições laboratoriais), a qual foi inicialmente denominada *Glomerella lindemuthiana*. Entretanto, esses estudos não foram conclusivos e muitas dúvidas foram surgindo, principalmente em relação a sua patogenicidade. Em 1970, após muitos anos de estudo, a fase sexual foi renomeada para *Glomerella cingulata* (Stonem Spaulde & V. Schrenk) f. sp. *phaseoli*. Nessa fase os esporos sexuais ou ascósporos são produzidos dentro de uma estrutura em forma de saco conhecida como asco. Os ascos localizam-se nos corpos de frutificação denominados peritécios, os quais recebem essa denominação por possuírem um formato semelhante ao de uma pêra. No gênero *Glomerella* os peritécios apresentam pigmentação escura e variam de 85 a 300 µm de diâmetro com ostíolos bem desenvolvidos (KIMATI et al., 1970).

Interessantemente, em 2003, ROCA et al. demonstraram em seus experimentos, a existência dos chamados “CATs” (Conidial anastomosis tubes) em *C. lindemuthianum*. Por meio de microscopia eletrônica, os pesquisadores puderam observar a ocorrência de anastomoses entre conídios, durante o crescimento dos isolados em laboratório, e até mesmo durante a infecção do hospedeiro. Segundo KISTLER & MIAO (1992), e COVERT (1998), em fungos como *C. lindemuthianum*, onde a reprodução sexual ainda não foi observada na natureza, a variabilidade genética poderia ser aumentada por mecanismos não-mendelianos que fossem capazes de gerar polimorfismos cromossômicos. Novas linhagens patogênicas capazes de superar as defesas do hospedeiro estão sempre surgindo e acredita-se que essas linhagens surjam por meio de algum tipo de recombinação. Os resultados obtidos por ROCA et al. (2003) sugerem que um estudo refinado dos CATs poderia resolver, ou pelo menos responder parte desse paradoxo existente entre as restritas formas de recombinação e a enorme variabilidade genética existente nesse fungo, revelando de fato se eles tem um papel importante nesses processos, já que seus trabalhos demonstraram que, por meio dessas conexões, pode ocorrer passagem de vacúolos, mitocôndrias e até mesmo de um núcleo inteiro.

A grande variabilidade genética existente neste fungo é demonstrada pela ocorrência de um extenso número de raças fisiológicas. Nos termos de RAVA et al. (1994), uma raça pode ser definida como a variabilidade patogênica ou capacidade do patógeno de causar doenças em determinados cultivares de um mesmo hospedeiro. Isso constitui uma enorme complicação para os programas de melhoramento, pois os

cultivares podem ser resistentes a certas raças e suscetíveis a outras. Desta forma, a cada nova raça que surge, cultivares resistentes podem tornar-se susceptíveis (BORÉM, 2005).

O primeiro relato acerca da especialização fisiológica e variabilidade patogênica existente em *C. lindemuthianum* foi feito em 1911 por BARRUS, ao demonstrar em seus experimentos que diferentes variedades de feijão respondiam de forma diferente quando inoculadas com os respectivos isolados. Até o ano de 2004 foram identificadas mais de 50 raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* nas diversas regiões produtoras de feijão no Brasil, sendo as raças 64, 65, 73, 81, 87 e 89 as de maior frequência no país (ANSARI et al., 2004; SILVA, 2004). Um trabalho mais recente realizado por DAMASCENO & SILVA et al. (2007) demonstrou que no estado de Minas Gerais prevalecem as raças 65, 73 e 81.

### **2.3- Genes de patogenicidade na interação planta-patógeno**

As várias definições propostas para os termos patógeno, patogenicidade, virulência e genes de patogenicidade, nas diferentes áreas do conhecimento, ilustram a enorme dificuldade e complexidade envolvida na formulação precisa de definições (CASADEVALL & PIROFSKI, 1999).

De acordo com IDNURM & HOWLETT (2001), o patógeno é um microrganismo capaz de causar danos ao hospedeiro. Já o termo patogenicidade pode ser entendido como a capacidade de um microrganismo causar danos ao hospedeiro e portanto, teria um caráter qualitativo: um organismo é ou não patogênico, não existindo variações. Por outro lado, o termo virulência seria a capacidade relativa de um organismo causar danos ao hospedeiro, ou seja, representa o grau de patogenicidade, a variação positiva ou negativa, inferior ou superior nos sintomas que o patógeno é capaz de causar de acordo com o potencial genético que possui, sendo, portanto, de caráter quantitativo. Finalmente, genes de patogenicidade seriam aqueles genes cuja expressão é necessária para o desenvolvimento da doença, mas que não são essenciais para completar o ciclo de vida do microrganismo.

No entanto, essas definições não são aceitas por todos os pesquisadores. OLIVER & OSBOURN (1995), por exemplo, explicam que essa definição proposta para genes de patogenicidade não poderia ser aplicada aos parasitas obrigatórios. Além disso, muitos fitopatologistas têm debatido fortemente as definições propostas para patogenicidade e virulência. De acordo com a terminologia proposta pela Sociedade

Americana de Fitopatologia, essas definições se arranjarão quantitativamente da seguinte maneira: *patogenicidade* = *agressividade* + *virulência*. Nesta classificação, patogenicidade seria a habilidade de um organismo em infectar um hospedeiro e causar doença. O termo agressividade denota se, e com que extensão, um organismo é capaz de atacar outros organismos. Ela deve ser acessada em uma ampla gama de genótipos hospedeiros, avaliando-se o desenvolvimento do patógeno em um determinado grupo de espécies ou isolados do hospedeiro. Virulência indica a severidade dos sintomas que um patógeno causa no hospedeiro por unidade de ataque (por exemplo, número de esporos depositados). Qualitativamente é a virulência que torna um parasita patógeno. Sem virulência, um parasita não é um patógeno (BOS & PARLEVLIET, 1995; THOMAS & ELKINTON, 2004).

Desde o contato inicial entre o patógeno e o seu hospedeiro, até o estabelecimento dos sintomas da doença, existem diversas etapas, como a deposição da unidade de infecção, penetração, estabelecimento das relações parasitárias e a colonização propriamente dita. Em cada um desses passos, o patógeno regula a expressão diferencial de genes essenciais de patogenicidade que vão possibilitá-lo suprimir as respostas de defesa da planta, sobrepor aos obstáculos para a colonização do tecido vegetal, promover a absorção dos nutrientes necessários à sua sobrevivência e ao mesmo tempo manter o seu hospedeiro vivo (AMORIM, 1995).

IDNURM & HOWLETT (2001) classificaram os genes de patogenicidade de fungos filamentosos em cinco categorias principais, de acordo com a etapa do processo de infecção da qual participam. Deste modo, existem:

- Os genes que codificam proteínas envolvidas com a formação de estruturas de infecção, como é o caso do apressório, responsável por criar uma elevada pressão de turgor, permitindo a penetração pela epiderme.
- Os genes que codificam proteínas envolvidas com a degradação da cutícula e da parede celular, como é o caso das enzimas cutinases e pectinases.
- Genes ativados em defesa às respostas do hospedeiro, como é o caso da ativação de genes do fungo em resposta à produção de metabólitos secundários pela planta, a citar as fitoalexinas.
- Genes que codificam proteínas envolvidas com a síntese de micotoxinas, as quais muitas vezes são específicas para seu hospedeiro.

- E por fim, os genes que codificam proteínas envolvidas em cascatas de sinalização em resposta às mudanças do ambiente, que são responsáveis por alterar significativamente a expressão de outros genes. Encontra-se nesta categoria o gene *pacC* que codifica um regulador transcricional envolvido com a resposta de fungos às alterações no pH ambiental.

Para avaliar a contribuição de um gene na patogenicidade de um organismo específico, várias técnicas têm sido utilizadas, e o avanço dos projetos de sequenciamento de genomas de muitas espécies tem possibilitado o surgimento de diversas outras técnicas moleculares para o estudo da patogenicidade em fungos (SOANES et al., 2002).

Dentre as técnicas mais comuns, a mutagênese ainda é a mais utilizada, sendo que nos últimos anos, a mutagênese tradicional vem sendo substituída pela mutagênese insercional, onde são empregados plasmídeos ou transposons para a inativação de genes. A vantagem desta técnica é que o gene fica etiquetado, podendo ser facilmente localizado e isolado (BROWN & HOLDEN, 1998; BALHADÈRE et al., 1999; DUFRESNE et al., 2000). Além da mutagênese insercional, pode-se destacar ainda outras técnicas como a construção e análise de bibliotecas de mutantes, a SAGE (análise serial de genes expressos), os microarranjos, o sistema de dois híbridos e até mesmo o uso combinado de mais de uma delas (LORENS, 2002).

#### **2.4- O fator de transcrição PacC e a regulação da expressão gênica pelo pH ambiental**

Para sobreviver e se multiplicar, os microrganismos devem possuir mecanismos de adaptação às condições ambientais. Essa adaptação às variações ambientais requer não apenas a garantia de um equilíbrio homeostático interno, mas significa também garantir que as moléculas expostas à condição ambiental (como por exemplo, as permeases, enzimas secretadas e metabólitos secundários) sejam produzidas somente naquela condição em que elas podem agir (PEÑALVA et al., 2008). Em numerosos grupos de microrganismos, o pH ambiental tem importante papel na determinação dos níveis de transcrição de muitos genes, o que pode influenciar no crescimento, na fisiologia e em processos de diferenciação do organismo (LAMB et al., 2001). Entre os genes regulados por pH estão aqueles que codificam enzimas secretadas, permeases e enzimas intracelulares que participam da síntese e exportação de outros produtos, tais como toxinas, antibióticos e compostos capazes de modificar o pH ambiental

(PEÑALVA & ARST, 2002; ARST & PEÑALVA, 2003; PEÑALVA & ARST, 2004; PEÑALVA et al. 2008).

Os fungos são organismos muito versáteis que ocupam os mais variados nichos ecológicos, incluindo entre eles, o tecido vegetal. Esta habilidade depende crucialmente da presença de mecanismos regulatórios que controlem a expressão de genes em resposta a sinais e variações das condições ambientais. Além disso, durante a interação planta-patógeno, o pH ambiental pode ser dinamicamente alterado pelos fungos. Enquanto alguns fungos modificam o pH do ambiente pela produção de ácidos orgânicos como o ácido oxálico, cítrico e glucorônico, outros, como é o caso de *Colletotrichum*, alcalinizam o meio pela produção e liberação de amônia (CARACUEL et al., 2003a; KRAMER-HAIMOVICH et al., 2006).

Considerando o pH do ambiente, um sistema regulatório controlando a expressão de genes foi identificado e caracterizado pela primeira vez no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, há cerca de 22 anos atrás (CADDICK et al., 1986). Desde então, este mecanismo também vem sendo estudado e caracterizado em outros fungos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (SU & MITCHELL, 1993), *Yarrowia lipolytica* (BLANCHIN-ROLAND et al., 1994), *Penicillium chrysogenum* (SUÁREZ & PEÑALVA, 1996), *Candida albicans* (BROWN & GOW, 1999), *Sclerotinia sclerotiorum* (ROLLINS & DICKMAN, 2001), *Fusarium oxysporum* (CARACUEL et al., 2003a), *Ustilago maydis* (ELVA et al., 2005), *Colletotrichum acutatum* (YOU et al., 2007) entre muitos outros.

A regulação da expressão de genes por pH também é encontrada em outros grupos de organismos, incluindo as bactérias *Salmonella typhimurium* (FOSTER et al., 1994), e *Escherichia coli* (WATSON et al., 1992), as quais têm sido intensamente estudadas. Há também regulação da expressão de genes pelo pH extracelular em tecidos animais, o que indica que esse tipo de mecanismo de sinalização é uma característica universal, presente nos diferentes grupos de seres vivos (DENISON, 2000).

O funcionamento geral deste sistema regulatório está bem caracterizado em *A. nidulans*, e requer a expressão e integridade de sete genes, designados respectivamente de *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall* (ARST & PEÑALVA, 2003).

O gene *pacC* codifica um regulador transcricional envolvido diretamente com a ativação e repressão de genes regulados pelo pH ambiental. Estudos demonstraram que esta proteína, em condições alcalinas encontra-se na sua forma ativa, e em condições ácidas, na sua forma inativa. Na sua forma ativa PacC é capaz de ativar a transcrição

dos chamados “genes alcalinos” e inibir a expressão dos chamados “genes ácidos”. Em condições ácidas, a proteína está na sua forma inativa, permitindo a expressão dos “genes ácidos” e não sendo capaz de ativar a transcrição dos “genes alcalinos”. A Tabela 1 resume os principais grupos de genes regulados por PacC em *A. nidulans*.

**Tabela 1-** Genes ou funções sob o controle da proteína PacC em *A. nidulans*.

Gene	Atividade ou processo	Condição de expressão
<i>pacA</i>	Fosfatase Ácida	Ácida
<i>xlnA</i>	Xilanases	Ácida
<i>abfB</i>	$\alpha$ -L-arabinofuranases	Ácida
<i>gabA</i>	GABA permease	Ácida
<i>stcU</i>	Ceto-redutase (síntese de esterigmatocistina)	Ácida
NC*	Fosfodiesterase	Ácida
NC*	Sensibilidade ao Molibdato	Ácida
NC*	Conidiação	Ácida
NC*	Tolerância à aminoglicosídios	Ácida
<i>palD</i>	Fosfatase Alcalina	Alcalina
<i>prtA</i>	Protease Alcalina	Alcalina
<i>xlnA</i>	Xilanases	Alcalina
<i>acvA</i>	ACV sintetase (biossíntese de penicilina)	Alcalina
<i>ipnA</i>	Isopenicilina N-sintase	Alcalina
<i>pacC</i>	Resposta ao pH	Alcalina
NC*	Tolerância ao Li <sup>+</sup>	Alcalina
<i>sidA</i>	Biossíntese de sideróforos	Alcalina
<i>mirA</i>	Captura de sideróforos nativos	Alcalina
<i>mirB</i>	Captura de sideróforos bacterianos	Alcalina
NC*	Crescimentos em baixas temperaturas	Alcalina

\* NC – Processos e atividades cujo gene envolvido ainda não foi determinado

Abreviações - **ACV**: $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetase;**GABA**:  $\gamma$ -aminobutirato (Adaptada de PEÑALVA et al., 2008)

Em *A. nidulans*, para que haja a ativação de PacC são necessárias duas etapas de processamento proteolítico, sendo que as proteínas codificadas pelos demais genes citados anteriormente se envolvem com essa cascata de sinalização e resposta celular da seguinte maneira: PalH e PalI são proteínas com domínios transmembrana que

funcionam como sensores de alteração do pH ambiental. O papel de PalC e PalF ainda é obscuro. PalA é uma proteína capaz de se ligar à dois motivos YPXL/I localizados no “box de sinalização para protease”, permitindo a interação de PalB, que por sua vez é responsável por uma das etapas do processamento proteolítico de PacC, necessário para sua ativação (PEÑALVA & ARST, 2004).

De acordo com ARST & PEÑALVA (2003), três formas da proteína PacC podem ser detectadas em extratos protéicos purificados de *A. nidulans*, as quais possuem respectivamente massa molecular de 72 KDa (PacC<sup>72</sup>), 53 KDa (PacC<sup>53</sup>) e 27 KDa (PacC<sup>27</sup>). PacC<sup>72</sup> representa a proteína completa com seus 674 resíduos de aminoácidos. Ela predomina em condições ácidas, onde está inativa, não possuindo papel conhecido na regulação transcricional. A ativação de PacC<sup>72</sup> em resposta à alcalinização do meio envolve duas etapas de processamento proteolítico. Primeiro, PacC<sup>72</sup> é convertida à PacC<sup>53</sup> por um processamento proteolítico via transdução de sinal dependente de pH, pela remoção de 180 resíduos de aminoácidos da região C-terminal da proteína. Esta reação é provavelmente catalisada pela proteína PalB, sendo que a clivagem ocorre dentro de uma sequência conservada de 24 resíduos denominada de “box de sinalização para protease”. O segundo processamento proteolítico, o qual é independente do pH ambiental, e catalisado pelo proteassoma (HERVÁS-AGUILAR et al., 2007), remove mais 245 resíduos de aminoácidos da cadeia C-terminal de PacC<sup>53</sup> deixando a região dedo-de-zinco intacta e formando PacC<sup>27</sup>, que constitui a forma ativa da proteína PacC, que por sua vez, atua ativando ou reprimindo a expressão de vários genes inclusive o próprio gene *pacC*. Sob condições ácidas, interações envolvendo três regiões de PacC<sup>72</sup> aparentemente previnem o acesso do proteassoma, embora a formação de pequenas quantidades de PacC<sup>27</sup> independente da sinalização por pH seja provavelmente atribuída à um equilíbrio dinâmico entre essa conformação “fechada” e a conformação “aberta” da proteína. Um sinal de localização nuclear sobrepõe os três dedos-de-zinco e portanto, ambos PacC<sup>27</sup> e PacC<sup>53</sup>, estão localizados no núcleo (HERVÁS-AGUILAR et al., 2007; PEÑALVA et al., 2008).

Para compreender claramente o processo de transdução de sinal que culmina na formação de PacC<sup>27</sup> e PacC<sup>53</sup>, é importante ainda, que se compreenda a participação da via celular de endocitose, já que os trabalhos mais recentes têm demonstrado uma estreita relação entre os dois processos. Endocitose é um processo que ocorre em todas as células eucarióticas, pelo qual as células internalizam porções de suas membranas lipídicas contendo proteínas embebidas. Seguindo a sua internalização por meio de

vesículas endocíticas, proteínas de membrana podem retornar do compartimento endossomal para a membrana plasmática ou, alternativamente, seguir a via degradativa que acaba por liberar o conteúdo no lúmen dos vacúolos (ou lisossomo para células de metazoários) para a degradação proteolítica. Em qualquer das vias, as proteínas passam por uma série de organelas membranosas necessitando de mecanismos de endereçamento para garantir que as proteínas endocitadas pela membrana sejam apropriadamente entregues ao seu destino final. A via degradativa que medeia o tráfego de receptores de membrana plasmática, canais iônicos e sistemas de transporte de nutrientes da membrana plasmática para o lisossomo ou vacúolos é denominada de via endocítica. Entretanto, em um crescente número de exemplos, os receptores de membrana plasmática não atingem o lisossomo, mas ao invés, permanecem nos endossomos. De fato, essa associação com os endossomos pode muitas vezes ser responsável pela sinalização celular (HURLEY & EMR, 2006).

Trabalhos recentes com o fungo *A. nidulans* indicam fortemente que a via de transdução de sinal em resposta ao pH representa um exemplo clássico de associação entre endocitose e sinalização celular. Neste caso, o papel da endocitose seria conectar os dois complexos espacialmente separados: aquele localizado na membrana plasmática, contendo as proteínas perceptoras do sinal; e a vesícula endossomal, na qual estariam presentes as outras proteínas envolvidas na cascata de sinalização (PEÑALVA et al. 2008).

Com relação à sua estrutura, a proteína PacC<sup>72</sup> de *A. nidulans* pode ser didaticamente dividida em diferentes regiões. Na extremidade N-terminal, PacC<sup>72</sup> apresenta três motivos protéicos conhecidos como “dedo de zinco” (Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>), os quais são responsáveis pelo reconhecimento da sequência consenso 5'-GCCARG-3' presentes na região promotora dos genes cuja expressão é regulada pelo fator de transcrição PacC. Acredita-se que o DZ1 (dedo-de-zinco 1) não interaja diretamente com a molécula de DNA, e sim com o DZ2. Já o DZ2 e DZ3, formariam juntos, o domínio de ligação à molécula de DNA. Esses três dedos-de-zinco estão sempre presentes na forma ativa da proteína (PacC<sup>27</sup>). Após a região que contém os motivos dedo-de-zinco, a proteína pode ser subdividida em 7 regiões: A região I, que corresponde à região de ativação da transcrição; a região II que contém o sinal de localização nuclear (NLS) e um sítio para protease, no qual ocorre o segundo processamento proteolítico; a região III, que consiste numa porção rica em glicina; a região IV, que é uma região rica no aminoácido glutamina; a região V, que corresponde a uma região rica em prolina e serina, podendo

ainda apresentar uma assinatura do cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ; a região VI, que apresenta uma seqüência conservada de aproximadamente 24 resíduos de aminoácidos denominada “box de sinalização para protease”, onde ocorre a primeira clivagem proteolítica, sendo esta realizada pela proteína PalB; por último, na porção C-terminal, a região VII que consiste numa região rica nos aminoácidos alanina, arginina e glutamina. É interessante ressaltar que o alinhamento de seqüências mostrou que as regiões codificadoras responsáveis pelos motivos dedo-de-zinco são altamente conservadas em uma grande variedade de fungos, incluindo Ascomycetos e Basidiomycetos, enquanto que as outras regiões da proteína tendem a ser conservadas apenas em fungos intimamente relacionados (TILBURN et al., 1995; ARST & PEÑALVA, 2003).

Como foi mencionado anteriormente, esse sistema de regulação por pH vem sendo estudado extensivamente e o gene *pacC* que codifica o regulador transcricional foi identificado e caracterizado em diversas espécies de fungos. Em *A. nidulans*, onde foi inicialmente caracterizado, o gene apresenta um tamanho de 3.371 pb. A comparação da seqüência genômica com a seqüência de cDNA, revela a presença de dois íntrons, contendo 86 e 58 pb, respectivamente. A proteína deduzida a partir da seqüência de aminoácidos apresenta 678 resíduos de aminoácidos. Análises por hibridização de DNA revelam que o gene *pacC* apresenta-se em cópia única no genoma de *A. nidulans* (TILBURN et al. 1995).

Em todos os outros organismos que já tiveram o gene *pacC* caracterizado, a grande maioria das características se conservam, embora possam existir pequenas variações no tamanho da seqüência de nucleotídeos, no tamanho da ORF traduzida e também no número de íntrons. Em *Trichoderma harzianum*, por exemplo, a seqüência genômica recentemente caracterizada apresenta 4500 pb, uma ORF de 620 resíduos de aminoácidos e três íntrons putativos contendo 127, 56 e 64 pb respectivamente (MORENO-MATEOS et al., 2007). Por outro lado, em *Colletotrichum acutatum* a seqüência genômica completa isolada apresenta 2866 pb, uma ORF que codifica 590 resíduos de aminoácidos e três íntrons putativos contendo 67, 71 e 77 pb (YOU et al., 2007). Em ambos os casos, análises por hibridização de DNA revelam que o gene *pacC* apresenta-se em cópia única no genoma. A Tabela abaixo lista uma série de fungos os quais já tiveram a seqüência do gene *pacC* isolada e caracterizada, incluindo entre eles, importantes fitopatógenos e patógenos humanos.

**Tabela 2-** Diversidade de fungos que apresentam o gene *pacC/HIM101* isolado e caracterizado.

<b>Organismo</b>	<b>Nº acesso genBank</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus nidulans</i>	CAA87390	Tilburn et al., 1995
<i>Aspergillus niger</i>	Q00203	MacCabe et al., 1996
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Q01864	Suárez & Peñalva, 1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_011836	Goffeau et al., 1996
<i>Candida albicans</i>	Q9UW14	Davis et al., 2000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Q9P413	Rollins & Dickman, 2001
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Q96X49	Schmitt et al., 2001
<i>Fusarium oxysporum</i>	Q870A3	Caracuel et al., 2003a
<i>Fusarium verticillioides</i>	Q873X0	Flaherty et al., 2003
<i>Neurospora crassa</i>	Q7RVQ8	Galagan et al., 2003
<i>Candida glabrata</i>	Q6FV94	Dujon et al., 2004
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BSZ4	Dujon et al., 2004
<i>Kluyveromyces lactis</i>	XP-453982	Dujon et al., 2004
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_754424	Niérman et al., 2005
<i>Cryptococcus neoformans</i>	XP_572292	Loftus et.al., 2005
<i>Magnaporthe grisea</i>	Q52B93	Dean et al., 2005
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CAA67927.1	Gonzalez-Lopez et al., 2006
<i>Colletotrichum acutatum</i>	ABL96218	You et al., 2007
<i>Trichoderma harzianum</i>	ABK60115	Moreno-Mateos et al., 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAB20756	Submissão direta
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Q96UW0	Submissão direta
<i>Aspergillus giganteus</i>	Q5XL24	Submissão direta
<i>Botryothinia fuckeliana</i>	AAV54519	Submissão direta
<i>Candida dubliniensis</i>	Q873Y3	Submissão direta
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Q8J1U9	Submissão direta
<i>Trichophyton rubrum</i>	Q9C1A4	Submissão direta
<i>Ustilago maydis</i>	CAG34353	Submissão direta
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	ACD56154	Submissão direta
<i>Crinipellis pernicioso</i>	ND*	Comunicação pessoal

\*ND – A sequência ainda não foi depositada no genBank e foi obtida por comunicação pessoal.

Além da participação da proteína PacC na cascata de sinalização em resposta ao pH ambiental, alguns estudos mais recentes têm demonstrado uma significativa relação da proteína PacC com a resposta adaptativa de alguns fungos ao estresse salino (LAMB

et al., 2001; CARACUEL et al., 2003b; ARÉCHIGA-CARVAJAL & RUIZ-HERRERA, 2005).

CARACUEL et al. (2003b), ao cultivar um mutante *pacC* de *F. oxysporum* em diferentes concentrações de Na<sup>+</sup> e Li<sup>+</sup>, observaram significativa sensibilidade do mesmo quando comparado com a linhagem selvagem a partir da qual foi obtido. Além disso, foram detectados elevados níveis destes cátions acumulados nas células da linhagem mutante. Ao analisar o crescimento de um mutante constitutivo *pacC<sup>c</sup>*, foi observado significativo aumento na tolerância a esses cátions tóxicos. Interessantemente, nenhuma diferença foi observada ao analisar o crescimento da linhagem selvagem e mutante na presença do cátion K<sup>+</sup> e de sorbitol, o que sugere a participação da proteína PacC na resposta ao estresse salino, mas não ao estresse osmótico. Quando a mutação do gene *pacC* foi complementada pela inserção de uma nova cópia, o mutante adquiriu novamente o fenótipo selvagem, caracterizado por um aumento na tolerância ao Na<sup>+</sup> e Li<sup>+</sup>. Isto sugere que o aumento na sensibilidade do mutante aos cátions foi causado unicamente pela ausência do alelo *pacC*.

Em diversos outros trabalhos, a deleção do locus *pacC* mostrou alteração significativa no crescimento e desenvolvimento de fungos de diversas formas: na filamentação, na formação de estruturas reprodutivas, na produção de enzimas importantes, na tolerância às variações ambientais e, até mesmo na patogenicidade (TILBURN et al., 1995, MACCABE et al., 1996; ROLLINS, 2003; ARÉCHIGA-CARVAJAL & RUIZ-HERRERA, 2005).

Para avaliar a contribuição do gene *pacCl* na patogenicidade de *C. lindemuthianum*, SOARES (2007) obteve um mutante *pacCl*, denominado Mutpac2 utilizando a técnica de mutagênese sítio-direcionada. Para isso foi construído um vetor de inativação denominado pBKpac::hph2, contendo o cDNA do gene *pacCl* interrompido por um transposon, o qual, possui no seu interior, o gene *hph*, de *Escherichia coli*, que confere resistência à higromicina. O vetor foi introduzido no fungo e o gene *pacC<sup>+</sup>* foi substituído pelo gene interrompido (*pacC<sup>-</sup>*). Em suas análises, além de demonstrar uma redução no crescimento em pH alcalino, SOARES (2007) também mostrou que a deleção do locus *pacC* em *C. lindemuthianum* afetou a patogenicidade do mutante: além de verificar uma redução nos sintomas típicos da doença (lesões necróticas contendo exsudados), a análise por microscopia óptica revelou a ausência de formação das hifas secundárias de penetração. Foi sugerido,

portanto, que o gene *pacCl* regula a expressão de genes envolvidos com a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica em *C. lindemuthianum*.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

#### 3.1- Microrganismos e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados com o isolado LV 49 - patótipo 81 (pertencente à Micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras) e o isolado LF - patótipo 89 (pertencente à coleção do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa) do fungo *C. lindemuthianum*. Também foi utilizada a linhagem mutante Mutpac2, obtida por SOARES (2007), no Instituto de Biotecnologia de Plantas (Laboratório de Fitopatologia Molecular), da Universidade de Paris XI, na França. Esses isolados foram estocados à -80 °C em glicerol 25%, utilizando uma suspensão concentrada de conídios (em torno de 10<sup>8</sup> conídios/mL). Quando necessário, os isolados foram ativados em meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose), pH 6.8, por crescimento à temperatura de 22 °C por 7 dias.

Para o isolamento do gene *pacCl*, foi utilizado o Banco Genômico de *C. lindemuthianum*, o qual foi construído por SOARES (2007) utilizando o *Lambda EMBL3/BamHI Vetor Kit* (Stratagene®), e que encontra-se armazenado à 4 °C.

Também foram utilizadas as linhagens bacterianas *Escherichia coli* XLI-Blue MRA (Stratagene®) e *E. coli* DH5 $\alpha$  (Promega®), pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, as quais encontram-se estocadas à -80 °C em glicerol 40%. Quando necessário, essas linhagens foram ativadas à 37 °C por esgotamento em meio de cultura LB (Luria-Bertani).

#### 3.2- Isolamento do gene *pacCl* a partir do Banco Genômico de *C. lindemuthianum*

Para o isolamento do gene *pacCl*, 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 vetor Lambda EMBL3. Para a triagem pelo banco, foi utilizado como sonda um plasmídeo contendo o cDNA correspondente ao gene *pacCl*, obtido a partir de uma biblioteca de cDNA construída

por DUFRESNE et al. (1998) no Laboratório LLPM do Instituto de Biologia de Plantas da Universidade de Paris XI, na França, o qual foi analisado por SOARES (2007). As condições utilizadas para a hibridização foram de alta estrigência: quatro horas de pré-hibridização à 65 °C; oito horas de hibridização à 65 °C e lavagens utilizando de baixa concentração salina ( 1ª- SSC 1X e SDS 1% ; 2ª- SSC 0,5X e SDS 1% ; e 3ª- SSC 0,1X e SDS 1%). A marcação da sonda foi realizada com o kit *Gene images random prime II* (Amersham Biosciences®), e os fragmentos de DNA marcados foram detectados utilizando o *Gene Images CDP-Star detection Kit* (Amersham Biosciences®), conforme instruções do fabricante. Os fagos recombinantes positivos para o gene *pacCl* isolados do banco, foram caracterizados por meio de clivagem com as enzimas de restrição *ApaI*, *EcoRV* e *HindIII*, e subsequente hibridização de DNA, respeitando as mesmas condições utilizadas para o isolamento.

### **3.3- Subclonagem do gene *pacCl***

A partir da sequência do cDNA de *pacCl* descrita por SOARES (2007), foram desenhados 12 (doze) oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3 e Figura 1a), dos quais dois (*pacCl* 1 e *pacCl* 9) foram utilizados para amplificar uma sequência de aproximadamente 1.8 Kb, referente à região codificadora do gene *pacCl*. Para esta reação de amplificação foi utilizada a *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Como molde, foi utilizado o DNA dos fagos recombinantes isolados.

Para subclonar a região flanqueadora 3' do gene *pacCl*, foi utilizada a técnica de iPCR (PCR inverso), a partir dos oligonucleotídeos *pacCl* 10 e *pacCl* 11, conforme descrito por OCHMAN et al. (1988) e esquematizado na Figura 1b.

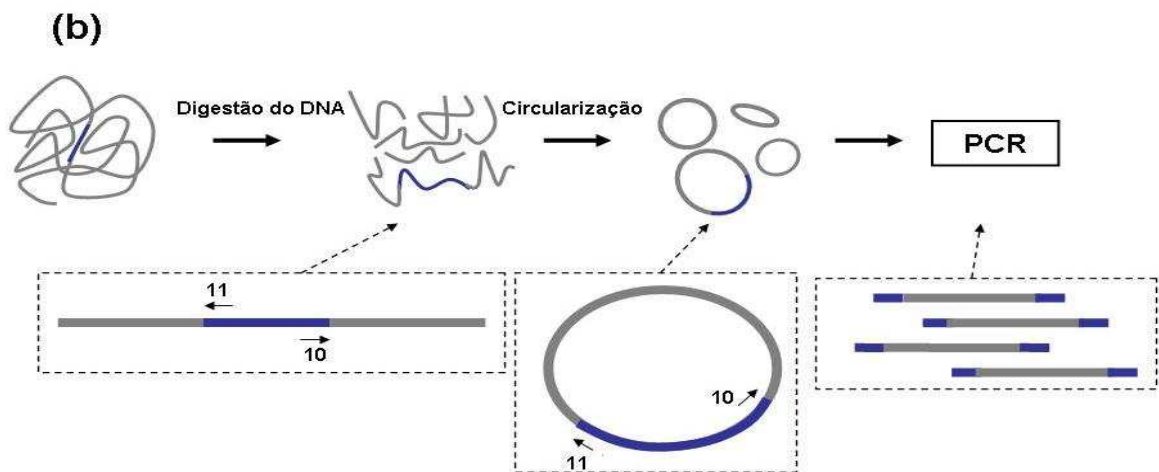
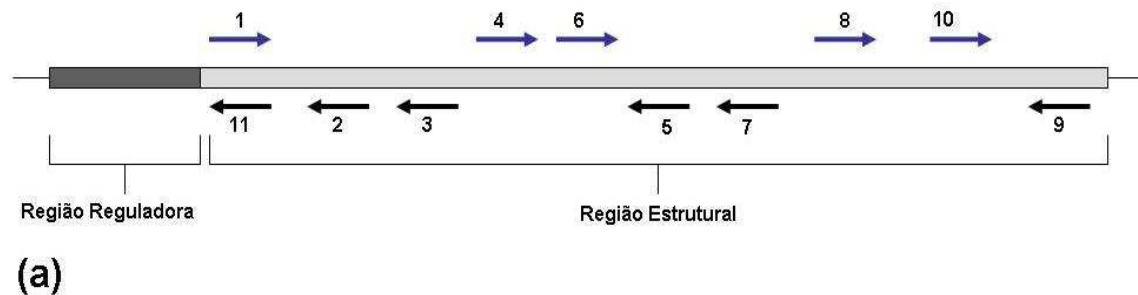
Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences®), e ligados ao vetor pGEM-T, utilizando o Kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®). Os clones obtidos foram propagados em células de *E. coli* DH5α ultra-competentes (INOUE et al., 1990) e quando necessário, extraídos e purificados utilizando o *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Ferramentas Life Sciences®).

### **3.4- Sequenciamento do gene *pacCl***

Os clones identificados tiveram suas sequências obtidas pelo método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER, 1977), utilizando o kit

*Thermo sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix* (Amersham Life Science®), conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático MegaBACE 500 do Laboratório de Genômica, BIOAGRO/UFV. Os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento estão listados na Tabela 3 e representados na Figura 1a.

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 os programas BLASTN e BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997). O programa DNAMAN foi utilizado para tradução das seqüências, e a identificação dos possíveis íntrons foi feita manualmente, por meio da busca pelas seqüências consenso e/ou por comparação com a seqüência de cDNA disponibilizada por SOARES (2007).



**Figura 1-** Estratégia adotada para a clonagem e o sequenciamento do gene *pacCl*. **(a)** Representação esquemática do gene *pacCl\**, mostrando a distribuição relativa dos diferentes oligonucleotídeos que foram utilizados nos experimentos. **(b)** Esquema representativo da técnica de iPCR para recuperação das bordas do gene. (Adaptado de OCHMAN et al. (1988)).

\* O esquema do gene bem como a distribuição dos oligonucleotídeos foram baseados na seqüência de cDNA do gene disponibilizada por SOARES (2007).

**Tabela 3-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')
pacCl 1*	CAA CTC CCC GAA GAG CAG TA
pacCl 2	CAC ACT TGT GAG GCT TGA GG
pacCl 3	TCT GGT TGG GAG AAA ACG AG
pacCl 4	CAA CCA ACA ACC CTT GAA CC
pacCl 5	GCA GGT AGT ACT GCT GGG TGA
pacCl 6	GCC GTT CTC TTC TCC CTC TT
pacCl 7	CGT CGT TGT TGA CCG ACA TA
pacCl 8	TGA CAG CAA CGA GCG TAG AC
pacCl 9*	ATA CGC AGG ATG GGG TAC AG
pacCl 10 <sup>i</sup>	GCA TTG ACC GTA GGG ACT TC
pacCl 11 <sup>i</sup>	TAC TGC TCT TCG GGG AGT TG
pacCl 12	ACG ACC TCA TCC AGA TCG AC
RTpacCl 1F <sup>Q</sup>	ACG ACC AAT GGC TGG AGA AC
RTpacCl 2R <sup>Q</sup>	CTT GGC CTC CTC GGA GAA C
RTpacCl 3F <sup>Q</sup>	CAG GAC GAC GAC GGT GAA G
RTpacCl 4R <sup>Q</sup>	AGG ACT TGC CGC AGG AAC T
CLrRNA 1 <sup>Q</sup>	TGA GTG GCA CAA GCA AAT AGT CA
CLrRNA 2 <sup>Q</sup>	TGC AAT TCA CAT TAC TTA TCG CAT T
CLGpDq1	CCG CAC TGC TGC TCA GAA C
CLGpDq2	GGA CAT GCC GGT GAG CTT
M13 F	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

\* Oligonucleotídeos que foram utilizados para amplificação e sequenciamento da porção codificadora do gene *pacCl*;

<sup>i</sup> Oligonucleotídeos que foram utilizados para sequenciamento e amplificação da região flanqueadora 3' do gene *pacCl*, pela técnica de iPCR;

<sup>Q</sup> Oligonucleotídeos que foram utilizados para avaliar o nível de expressão do gene *pacCl* pela técnica de Q-PCR.

Os demais oligonucleotídeos foram utilizados para sequenciamento de diferentes porções do gene *pacCl*, como mostra a Figura 1a.

### 3.5- Análise filogenética do gene *pacCl*

Para avaliar a capacidade do gene *pacCl* na reconstrução filogenética de fungos, sequências de nucleotídeos do gene *pacC/HIM101*, bem como a sequência de aminoácidos deduzida, da proteína em questão, pertencentes às diferentes classes de

fungos verdadeiros e já depositadas no banco de dados (GenBank), foram acessadas e filogeneticamente comparadas à sequência de *pacCl* que foi obtida.

O programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994) foi utilizado inicialmente para o alinhamento das sequências, sendo que algumas correções foram feitas manual e visualmente, utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

Para as inferências filogenéticas foi utilizado o método de reconstrução Neighbour joining (NJ). A árvore de NJ foi obtida utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al. 2007), sendo que o modelo de substituição foi escolhido manualmente. Após obtenção da árvore, esta foi topologicamente analisada considerando a recente classificação taxonômica proposta para os fungos.

### **3.6- Determinação do número de cópias do gene *pacCl*, e caracterização molecular do mutante *pacCl* (Mutpac2)**

#### **3.6.1- Obtenção de massa micelial**

Para obtenção do micélio, uma suspensão de aproximadamente  $10^7$  conídios/mL foi obtida a partir do crescimento das linhagens (selvagem e mutante) por 10 dias, a 22 °C, em tubos de ensaio autoclavados duas vezes por uma hora, contendo vagens fixadas em ágar-água. Posteriormente, cerca de  $10^6$  desses conídios foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura GPYECH líquido (ANSARI et al., 2004). As placas foram incubadas em câmara de crescimento por aproximadamente cinco dias à temperatura de 22 °C. Em seguida o micélio foi coletado, lavado gentilmente com água destilada e congelado com nitrogênio líquido.

#### **3.6.2- Extração de DNA total**

O micélio coletado foi macerado com a utilização de pistilo e nitrogênio líquido até se tornar um pó bem fino. Ao material obtido foram adicionados 15 mL de tampão de extração de DNA total de fungos (Tris-HCl 200 mmol . L<sup>-1</sup> pH 8.0; EDTA 50 mmol . L<sup>-1</sup>; NaCl 250 mmol . L<sup>-1</sup>; SDS 2%) e a amostra foi incubada no banho a 70 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 15 mL de clorofórmio-álcool-isoamílico, o material foi homogeneizado e incubado no gelo por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 14000g por 40 minutos, a fase aquosa foi coletada, transferida para outros tubos e acrescida de 120 µL de acetato de amônio para cada 200 µL de solução. A amostra foi homogeneizada, incubada no gelo por 1 hora e centrifugada à 4500g por 40 minutos. O sobrenadante foi transferido para outros tubos, adicionado de igual

volume de isopropanol e mantido à temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação à 4500g durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado à temperatura ambiente para secar. Logo após, o mesmo foi ressuspensionado em 1 mL de água mili-Q autoclavada, adicionado de igual volume de fenol/clorofórmio 1:1, e agitado gentilmente por 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000g por 10 minutos, sendo a fase aquosa coletada cuidadosamente e transferida para outros tubos, aos quais foi adicionado igual volume de clorofórmio. Novamente a amostra foi homogeneizada gentilmente por 10 minutos, centrifugada a 12000g por 10 minutos, sendo a fase aquosa transferida para outros tubos, acrescida de NaCl (100 mmol . L<sup>-1</sup>), e igual volume de isopropanol. Após 30 minutos à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 12000g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com etanol 70 % e colocado para secar a temperatura ambiente. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 50 µL de água mili-Q autoclavada, acrescido de 3 µL de RNase (10 mg/mL) e incubado à 37 °C por 30 minutos. Os tubos contendo o DNA total foram então armazenados a – 20 °C.

### 3.6.3- Hibridização de DNA

Para determinação do número de cópias do gene *pacCl*, alíquotas de 5 µg de DNA total da linhagem selvagem foram digeridas com as enzimas *XbaI*, *EcoRV* e *HindIII* (Promega®). Para a caracterização do mutante *pacCl*, o DNA total da linhagem selvagem e mutante foi clivado com a enzima *HindIII*. A escolha dessas enzimas foi feita mediante análise do perfil de restrição da seqüência de estudo, utilizando-se o programa NEBcutter 2.0 (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 40 minutos em solução de desnaturação (NaCl 1,5 mol . L<sup>-1</sup>; NaOH 0,5 mol . L<sup>-1</sup>), 40 minutos em solução de neutralização (NaCl 1,5 mol . L<sup>-1</sup>; Tris-HCl pH 8.0 0,5 mol . L<sup>-1</sup>), e encaminhado à montagem do aparato de transferência do DNA para a membrana de náilon (Duralon-UV<sup>TM</sup>-Stratagene®). Após transferência, o DNA foi fixado à membrana utilizando o aparelho (UV Crosslinker UVC 500). A hibridização ocorreu por 18 horas à 65 °C. A sonda utilizada foi obtida pela clivagem do plasmídeo pGpac31 com a enzima *NotI*, a qual libera um fragmento de aproximadamente 1.8 kb, correspondente à região codificadora do gene *pacCl*, isolada do Banco Genômico de *C. lindemuthianum*. Para marcação e detecção dos fragmentos de DNA marcados, foi utilizado o kit *Gene Images AlkPhos*

*Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences®), conforme instruções do fabricante.

### **3.7- Análise da expressão do gene *pacCl* por PCR Quantitativo, durante a cinética de infecção**

#### **3.7.1- Obtenção de conídios e condições de inoculação**

Uma suspensão de aproximadamente  $10^7$  conídios/mL foi obtida a partir do crescimento da linhagem LF – patótipo 89, de *C. lindemuthianum*, conforme já descrito anteriormente (item 4.6.1). Concomitantemente, sementes do cultivar Rosinha de feijão-comum foram germinadas e as plântulas foram crescidas em câmara de crescimento apropriada por dez dias. Em seguida, folhas cotiledonares excisadas tiveram ambas as superfícies assepticamente inoculadas com a suspensão de conídios, utilizando um pincel previamente esterilizado. Essas folhas inoculadas foram mantidas em placas de Petri contendo discos de papel umedecidos em água destilada estéril, incubadas a 22 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz ( $166 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) e 8 (oito) horas de escuro. As folhas inoculadas foram recolhidas e congeladas em nitrogênio líquido em intervalos regulares de 24 horas por sete dias, de modo a recobrir as diferentes etapas do processo de infecção por *C. lindemuthianum*. Como controle negativo, folhas foram inoculadas com água destilada estéril, e acompanhadas ao longo do processo.

Para utilizar como referência padrão na análise por PCR quantitativo,  $10^6$  conídios foram inoculados em 25 mL de meio de cultura GPYECH líquido (ANSARI et al., 2004), conforme descrito no item 4.6.1. O micélio obtido também foi congelado em nitrogênio líquido, e utilizado na etapa subsequente de extração de RNA.

#### **3.7.2- Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total, as folhas de feijoeiro e/ou o micélio coletado, foram congelados em nitrogênio líquido e macerados utilizando pistilo e almofariz até formarem um pó bem fino. Aproximadamente 200 mg de tecido macerado foram transferidos para um microtubo, acrescidos de 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen®) e 150  $\mu\text{L}$  de PVP-40 20% (Polivinil pirrolidona- 40 (Sigma®)). As amostras foram homogeneizadas por 20 segundos, mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas à 12.000g por 20 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e acrescida de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. As amostras foram

gentilmente homogeneizadas, mantidas à temperatura ambiente por 3 minutos e novamente centrifugadas à 12.000g por 20 minutos. A fase aquosa novamente foi transferida para microtubos e acrescida 250 µL de solução de precipitação (Citrato de sódio 800 mmol . L<sup>-1</sup>; Cloreto de sódio 1200 mmol . L<sup>-1</sup>) e 250 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas à 12.000g por 10 minutos. Finalmente, após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com etanol 80% e ressuspensionado em 40 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase RQ1 RNase-free (Promega®). O RNA total extraído teve sua pureza e quantificação determinadas a 260 nm por espectrofotometria, utilizando-se o programa RNA Quantify and Purity Check, do espectrofotômetro Pharmacia Biotech. Ultraspec® 3000.

### 3.7.3- Síntese de cDNA e PCR Quantitativo em tempo real

As amostras de RNA obtidas foram utilizadas para avaliar quantitativamente o nível de expressão do gene *pacCl*, nas diferentes fases do processo de infecção, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Inicialmente, alíquotas de 1 µg do RNA total extraído foram utilizadas para a síntese da primeira fita do cDNA, utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega®) conforme instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA fita dupla, dois pares de oligonucleotídeos dentre os listados na Tabela 1 (RTpacCl 1/RTpacCl 2; RTpacCl 3/RTpacCl 4) foram utilizados para amplificar um fragmento do gene *pacCl*, e também para construção da curva padrão. Para a normalização dos níveis de expressão, foi utilizado como controle endógeno o gene constitutivamente expresso *gpdA*, que codifica a enzima gliceraldeído desidrogenase de *C. lindemuthianum*. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos CLgpd 1 e CLgpd 2 (também listados na Tabela 3). A reação de Q-PCR foi realizada utilizando o kit *SYBR® Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystems®) sendo que as leituras foram realizadas utilizando o equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems®). Para a quantificação das amostras foi utilizada a quantificação relativa pelo método de curva padrão (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A curva padrão para este experimento foi realizada com 7 pontos (diluições 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-10</sup>), garantindo que todos os pontos apresentados pela amostra desconhecida fossem incluídos na curva. Como calibrador foi utilizado o RNA total extraído do fungo cultivado em meio de cultura líquido. Isto

significa que todos os valores obtidos foram expressos como  $n$ -vezes o valor obtido para o calibrador. A amplificação do gene alvo foi normalizada com a amplificação do controle endógeno, para correção de variações de amplificação devido à quantidade de material inicial presente nas amostras, condições de processamento e presença de inibidores de PCR. Todas as reações foram amplificadas em triplicata. Neste experimento, foi avaliado e comparado o nível de expressão do gene *pacCl* em 5 diferentes pontos do ciclo de infecção de *C. lindemuthianum*: 2 dias; 4 dias; 5 dias; 6 dias e 7 dias.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

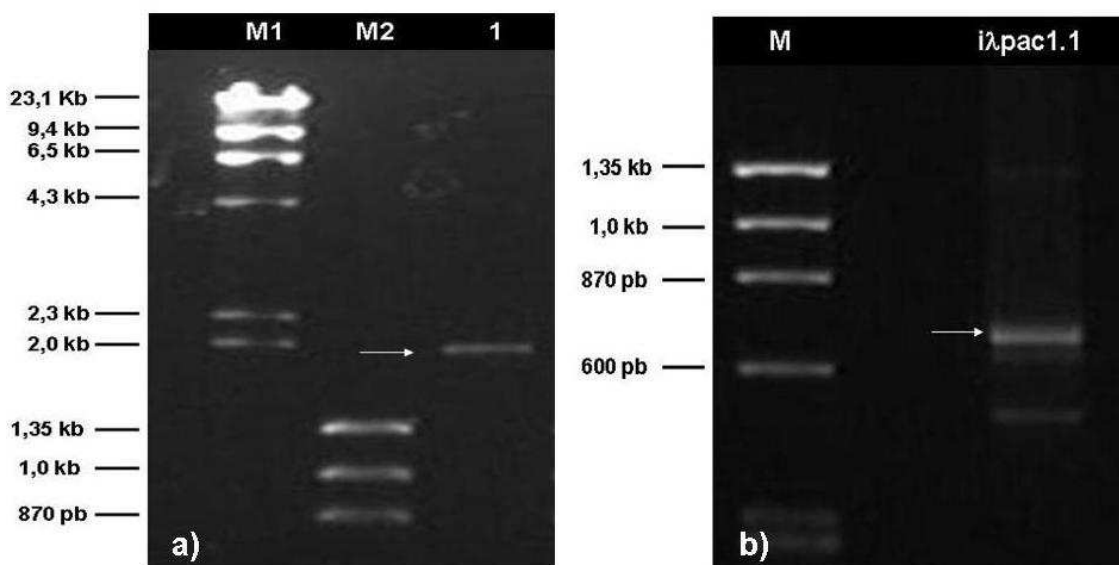
### 4.1- Isolamento e clonagem do gene *pacCl*

Após a terceira triagem no banco genômico de *C. lindemuthianum*, utilizando o cDNA do gene *pacCl* como sonda, foram isolados quatro fagos recombinantes positivos para o gene *pacCl*, os quais foram identificados como  $\lambda$ pac1.1,  $\lambda$ pac2.1,  $\lambda$ pac3.1 e  $\lambda$ pac4.1, respectivamente. No trabalho realizado por NOGUEIRA (2007), os diferentes perfis de restrição de DNA apresentados por esses fagos, mostraram que os quatro fagos recombinantes isolados eram, de fato, diferentes entre si. Esses fagos foram utilizados subsequentemente para subclonagem do gene *pacCl*.

A análise por hibridização, após a restrição do DNA desses fagos com as enzimas *ApaI*, *EcoRV* e *HindIII* (as quais não apresentam sítios de clivagem na sequência do cDNA), confirmou a presença do gene *pacCl*, porém em fragmentos de DNA que possuíam um tamanho molecular acima de 6 kb em todos os casos, o que dificultou a clonagem do gene (NOGUEIRA, 2007). Para solucionar esse problema, uma nova estratégia foi delineada para a subclonagem. A partir da sequência de nucleotídeos correspondente ao cDNA do gene *pacCl* (disponibilizada por SOARES, 2007), um par de oligonucleotídeos identificados como pacCl 1/pacCl 9 (Tabela 3 e Figura 1), foi desenhado e permitiu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,8 kb (Figura 2a) que corresponde à região codificadora do gene *pacCl*. Essa amplificação foi realizada com uma *taq* DNA polimerase de alta processividade, conforme descrito no item 3.3. Esse produto de PCR foi clonado no vetor pGEM - T Easy, e o clone obtido foi denominado pGpac31.

Adicionalmente, a técnica de iPCR (PCR inverso) também foi utilizada no isolamento de parte do gene *pacCl*. Para esta técnica, foi utilizado como molde o DNA dos quatro fagos recombinantes isolados do banco genômico, clivados com diferentes enzimas de restrição, e o par de oligonucleotídeos identificados como pacCl 10 e pacCl 11 (Tabela 3 e Figura 1). Esta técnica permitiu a recuperação de um fragmento de DNA de 650 pb (Figura 2b) pela amplificação usando o DNA do fago  $\lambda$ pac1.1 como molde. O produto de PCR foi purificado do gel, clonado no vetor pGEM - T Easy e o clone foi identificado por ipGpac47. O sequenciamento deste clone mostrou que o fragmento recuperado continha parte das regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene em estudo. A junção e análise *in silico* das duas seqüências clonadas, permitiu a obtenção de um

fragmento total de 2546 pb, referente ao gene *pacCl* de *C. lindemuthianum*, o qual foi caracterizado subsequentemente.



**Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA obtidos, correspondentes ao gene *pacCl*. (a) Resultado da amplificação usando os oligonucleotídeos *pacCl* 1/*pacCl* 9, os quais flanqueiam a região codificadora do gene. (M1) DNA do bacteriófago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; (M2) DNA do bacteriófago  $\phi$ X174 digerido com a enzima *HaeIII*; (1) A seta indica o fragmento de DNA de aproximadamente 1,8 kb obtido pela amplificação. (b) Resultado da técnica de iPCR usando os oligonucleotídeos *pacCl* 10/*pacCl* 11. (M) DNA do bacteriófago  $\phi$ x174 digerido com a enzima *HaeIII*; (*iλpac1.1*). A seta indica o fragmento de DNA obtido pela amplificação usando o DNA do fago  $\lambda$ *pac1.1* como molde.

#### 4.2- Sequenciamento e caracterização do gene *pacCl*

O sequenciamento dos clones pGpac31 e ipGpac47, utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 1a, permitiu a obtenção de uma sequência total de 2.546 pb, a qual apresenta toda a porção codificadora do gene *pacCl* de *C. lindemuthianum*, e parte das regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene (Figura 3).

A análise das seqüências permitiu a identificação de uma proteína contendo 581 aminoácidos e um códon de parada, sendo, portanto codificada por uma ORF que apresenta 1746 pb. Essa ORF está flanqueada por uma seqüência 5' de 204 pb e por uma seqüência 3' de 403 pb. Na Figura 3, as regiões flanqueadoras e os íntrons do gene estão representados em letras minúsculas, enquanto a ORF está representada em letras maiúsculas. O códon de iniciação **ATG** (metionina), localizado na posição 207, está evidenciado em negrito e letras maiúsculas, marcando o possível ponto de início da

tradução da proteína, dentro do consenso CACCATGTC (GURR et al., 1987), marcado pela caixa de texto. Deve ser observado que a partir dessa posição, duas numerações são apresentadas na Figura: uma para a seqüência de nucleotídeos do gene e uma para a seqüência de aminoácidos da proteína deduzida. O códon de parada da tradução TGA foi identificado na posição 2142, o que indica que a proteína deduzida apresenta 581 resíduos de aminoácidos.

Na região não codificadora 5', foram encontrados dois cis-elementos típicos de genes eucariotos de fungos filamentosos: uma seqüência CAAT e uma região rica em CT. O elemento CAAT foi encontrado na posição 12 da seqüência de nucleotídeos, e está à 196 pb do códon ATG de início da tradução. Esse resultado encontrado foi consistente com o que é encontrado na maioria dos genes de fungos, cujos elementos CAAT são posicionados à uma distância que pode variar de 150 a 300 pb do ponto de início da tradução. Nas regiões promotoras de genes eucarióticos, esses elementos podem atuar como sinais básicos para a transcrição, determinando, muitas vezes, o sítio de início e até mesmo a eficiência do processo (GURR et al., 1987). Na região compreendida entre as posições 21 e 92 foram encontrados diversos elementos CT. Essa região rica em CT também é muito comum na porção reguladora de genes eucarióticos, principalmente em fungos filamentosos e leveduras. Análise por deleção de alguns desses elementos em genes de *A. nidulans*, mostraram que eles são importantes na determinação da exata posição do início da transcrição (GURR et al., 1987). Na figura 3, os elementos CAAT e CT da região flanqueadora 5' encontram-se destacados em negrito.

A proteína PacC é capaz de se ligar ao consenso 5' GCCARG 3' regulando a expressão de uma série de genes, incluindo o próprio gene *pacC* (ESPESO et al., 2000). Entretanto, na sequencia flanqueadora 5' obtida, essa seqüência não foi encontrada, possivelmente pelo curto tamanho da seqüência recuperada.

Na região não codificadora 3', um sinal de poliadenilação típico AATAAA de genes de fungos não foi encontrado, mas foi encontrada a seqüência AAATA, à 207 pb do códon de parada, posição relativamente semelhante àquela encontrada em outros genes de fungos filamentosos, geralmente em torno de 180 pb após o códon de parada (GURR et al., 1987).

-204cggca cga ggg caa tcg gtc **ctc** cac **ctg cct** caa **gct** aga acg tat  
 -159 cca **cct** gca **cct** gca **ctc** acg aac **act** caa aac aca ccc gac **cct**  
 -115 tcg atc tta ttt ccg caa cgg gtc tcg gcc gat tcc att ctt ccg  
 -69 gcc tcc cct cac cga gcc cac **cag ctc** ggt caa cct cgc gaa cgc  
 -24 cag tca aac ttc cag tca ga**cacc ATG TCT** GCT AAG CAA GAA AAC  
**01** M S A K Q E N  
 22 GAG TCT TCG GGA AGC AAC TCC CCG AAG AGC AGT ACT CCC GCC CCT  
**8** E S S G S N S P K S S T P A P  
 67 TCG ACG GCC ACC AGC AAC ACC TCC CAG AGC ACC GGC GCC AAC AGC  
**23** S T A T S N T S Q S T G A N S  
 112 GCC GAG GAC AAT CTG ATT TGC AAA TGG AAC TCG TGC AAC CTC AAG  
**38** A E D N L I **C K W N S C N L K**  
 157 TTT GTC ACG CCC GAG **gtagtt**acccactactcctgctgccttgtccaaacgtac  
**53** F V T P E  
 212 gttgtctaacgcccgtctcag GCC CTC TAC GAG CAC ATC TGC GAG CGC CAT  
**62** A L Y E H I C E R H  
 263 GTC GGT CGC AAG AGC ACC AAC AAC CTC AAC CTC ACC TGC CAG TGG  
**68** V G R K S T N N L N L T **C Q W**  
 308 GCT TCC TGC AGG ACG ACG ACG GTG AAG CGT GAT CAC ATC ACC TCT  
**83** A S C R T T T V K R D H I T S  
 353 CAC ATT CGC GTC CAC GTC CCC CTC AAG CCT CAC AAG TGT GAG TTC  
**98** H I R V H V P L K P H K **C E F**  
 398 TGC GGC AAG TCC TTC AAG CGC CCC CAG GAC TTG AAG AAG CAT GTC  
**113** C G K S F K R P Q D L K K H V  
 443 AAG **gtattc**agacctcgcaacccaaccctccgccccagacagtcgactgacactactccag  
**128** K  
 504 ACC CAC GCC GAC GAC TCT GTC CTC GTC CGA TCC CCC CAG GAC CAG  
**129** T H A D D S V L V R S P Q D Q  
 549 GGC ATG AAC GGC TAT CGG GCG CAG CCT GGC AAG **gtatgt**ccagctcac  
**145** G M N G Y R A Q P G K  
 597 aatttgcgcatccaaaggctcctcctcgttttctcccaaccagaggctaagtgtgcctccag  
 656 GCT TCT TCT AGC TAC TAT GAT CAT AAT GGC CAC ATG AGG ACT AAC  
**155** A S S S Y Y D H N G H M R T N  
 701 TCG GCC GCC TTC GCG CAC CAG GCT GGG CAT GCT AGC TAC TAT GCA  
**170** S A A F A H Q A G H A S Y Y A  
 746 CCC CAA CCA TCT ACA AAC TAT GGA CTG TAC TTC AAC CAA CAA CCC  
**185** P Q P S T N Y G L Y F N Q Q P  
 791 TTG AAC CCT CCC CGA TCC GAG TAC ATT GGC CAC CAC GGC GGC TAC  
**200** L N P P R S E Y I G H H G G Y  
 836 GAC AAC CGC GCC AAA CGC GCC TTC GAC ATG GTC GAC GAC TTC TTC  
**215** D N R A K R A F D M V D D F F  
 881 GCC CAC GCT AAG CGT CGC CAG GTC GAC CCC ACC TCC TAC CAG CAG  
**230** A H A K R R Q V D P T S Y Q Q  
 926 GTC GGC CGT TCT CTT CTC CCT CTT CAC GGC GCT CTC GGC CTC CAC  
**245** V G R S L L P L H G A L G L H  
 971 ACC GGC CCC ATG CCC GGC TCC GAC TAC ATG GCC GGC CCC CCT CAG  
**260** T G P M P G S D Y M A A P P Q  
 1016 CAG CAC CCA CAC CAC CAG CAC GTC GGC CAC GGT CCC TCT GGT CCC  
**275** Q H P H H Q H V G H G P S G P  
 1061 GGC CCC CTC ACC CAG CAG TAC TAC CTG CCG CCC ATG CCC AAC GCC  
**290** G P L T Q Q Y Y L P P M P N A  
 1106 CGC ACC AAG AAC GAC CTC ATC CAG ATC GAC CAG ATC CTC GAG CAG  
**305** R T K N D L I Q I D Q I L E Q  
 1151 ATG CAG AGT ACC GTC TAC GAG AAC GCC AAC CAG GCC ACG CAT GGC  
**320** M Q S T V Y E N A N Q A T H G  
 1196 ATC CAC ATC CAC GGC CAG AAC ACC TTT GAC CTG CGC CAT AGC CCC  
**335** I H I H G Q N T F D L R H S P  
 1241 TCG CCA CCC GGC GGC CAC AGA GGA TCC ATC GCC GGT ATG TCG GTC  
**350** S P P G G H R G S I A G M S V

```

1286 AAC AAC GAC GGC TAC GGC GCC GTG TCT GCC GCA CAC ATG GCC TCG
365 N N D G Y G A V S A A H M A S
1331 CCG CTC ACC GCC ATC TCC TCC ACC GGT ACC CCC GCC GTC ACT CCT
380 P L T A I S S T G T P A V T P
1376 CCC TCG AGC ACC ATG TCC TAC ACT TCC GGT CAC TCG CCC AGT CCG
395 P S S T M S Y T S G H S P S P
1421 TCT TCC TCG GGC ATG TCT CCT CAA TCC AGA CAC AGC TCT ACC GCC
240 S S S G M S P Q S R H S S T A
1466 TCC TCG GTC ATG TAC CCC AAC TTG CCT GCC GTC AGT TCC GAT CTT
425 S S V M Y P N L P A V S S D L
1511 CCC CGG AGT CGA CAA CGT CGA CTT TCG GGA ACC CAG CTT GAC AGC
440 P R S R Q R R L S G T Q L D S
1556 AAC GAG CGT AGA CGC TAC TCT GGT GGC ATG TGC AGC GGG CCG CCC
455 N E R R R Y S G G M C S G P P
1601 CTG TCG CCC AGG TCG CCC ATC ATC TTT GAG GAC AGT CTC TGG CGT
470 L S P R S P I I F E D S L W R
1646 CAC TAC TCC CAA GGC GTC TGT GGC TTC GTC CAT CGG CTC TCC TTC
485 H Y S Q G V C G F V H R L S F
1736 CGC GTC TTT GAG TCT GAC TCG AGC GAG GGC GCA CGC GAA CGC GAG
500 R V F E S D S S E G A R E R E
1781 GAG AAG TAC GAC CAA TGG CTG GAG AAC ATG CGC ACC ATT GAG GCT
515 E K Y D Q W L E N M R T I E A
1826 CTC CGC GAG TAC ATC CGC GAC CGC ATT GAC CGT AGG GAC TTC TCC
530 L R E Y I R D R I D R R D F S
1871 GAG GAG GCC AAG TCA CCC GCG GCC AGC CGT CTC AAG TCC CCG GAG
545 E E A K S P A A S R L K S P E
1916 CCC ATG GAG GTC GAT GCC AAG CCG TCA CCA CCG GCA CCG CTG TAC
560 P M E V D A K P S P A A P L Y
1961 CCC ATC CTG CGT ATG CCC AAC TGA ggc acc ggc gct tga gta gga
575 P I L R M P N * 581
2006 ttg atg aga aga gcc cca gac aaa ctg ggc gcg tgt acc aac agc
2051 tgt ctg caa gcg tgt ttc gtc gaa aag ttt cac agc aaa aga aaa
2096 ggg caa agt gat ggc gtc aac ttt ggc tcg aat tct att cta cag
2141 cat tct ttc tta tcc cat tgc gcg gca ccg caa tac ggc ttc tgg
2186 caa ata tct ctt acg cct gtc gaa gcc tcc cga cct ctt tgt tta
2231 cgt tac cca tac cca agt cgg cgg atg atg aga ggg gaa gtg gat
2276 tga att acg cag tct ccc atg gac gca gat gga ttt cta ccg ggc
2320 gca tga agt ccc ccg gtg aac caa acc aaa taa aac aca aaa caa
2366 acg aaa aaa aaa aaa aaa aaa - 2546

```

**Figura 3- Sequência de nucleotídeos do gene *pacCl* e sequência deduzida de aminoácidos da proteína PacCl de *C. lindemuthianum*.** Duas séries de números são mostradas na Figura: a primeira - 1 a 2.546 - representa a sequência de nucleotídeos; a segunda - 1 a 581 - representa a sequência de aminoácidos. A sequência codificadora esta representada em letras maiúsculas, e as regiões flangeadoras 5' e 3', bem como os íntrons, estão representados em letras minúsculas. As demais regiões importantes, e alguns *cis* elementos estão destacados conforme descrito no texto.

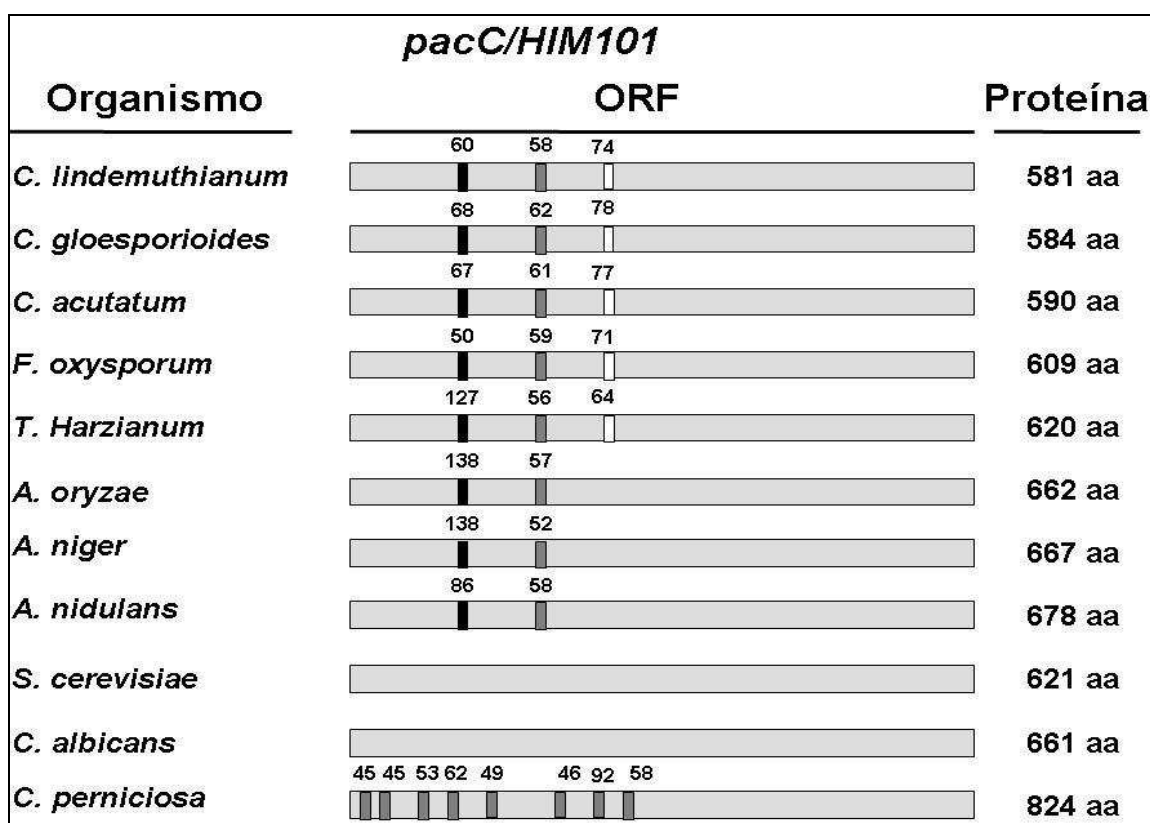
A análise comparativa entre a sequência de nucleotídeos do gene *pacCl* e a sequência do cDNA obtida por SOARES (2007), permitiu a identificação de três íntrons (Figuras 3 e 4). O primeiro íntron contém 60 pb e está localizado na posição 378-438 da escala utilizada. O segundo íntron contém 58 pb e está localizado na posição 651-709. O terceiro íntron contém 74 pb e está localizado na posição 787- 861. Em todos os íntrons encontrados na sequência, foi identificado o *cis* elemento 5' GT ... AG 3'. Essa sequência consenso está amplamente distribuída em genes de fungos, e é considerada de

extrema importância para reconhecimento dos sítios de excisão pelo complexo de remoção de íntrons: o spliceossomo (BALLANCE, 1986).

Resultados semelhantes foram obtidos por muitos trabalhos de caracterização do gene *pacC*. Em *F. oxysporum* (CARACUEL et al., 2003a), *T. harzianum* (MORENO-MATEOS et al., 2007) *C. acutatum* (YOU et al., 2007), e *C. gloesporioides* (GenBank EU671075), por exemplo, a ORF putativa apresenta uma seqüência de nucleotídeos que varia de 1770 pb (*C. acutatum*) à 2107 (*T. harzianum*). Além disso, a seqüência do gene *pacC* de todos esses fungos apresenta também 3 íntrons, com tamanhos variando de 50 a 127 pb (Figura 4).

Conforme pode ser observado na Figura 4, o gene *pacC* da grande maioria dos fungos analisados apresenta três íntrons, os quais mantiveram suas posições relativas ao longo do curso evolutivo. Interessantemente, as cinco espécies estudadas que apresentam três íntrons (*C. lindemuthianum*, *C. gloesporioides*, *C. acutatum*, *T. harzianum* e *F. oxysporum*) pertencem à Classe dos Sordariomicetos, Filo Ascomicota. Do mesmo modo, as três espécies listadas que apresentam dois íntrons (*A. niger*, *A. oryzae* e *A. nidulans*), pertencem à Classe dos Eurotiomicetos, Filo Ascomicota. As duas espécies de leveduras listadas (*S. cerevisiae* e *C. albicans*), as quais não apresentam íntrons, pertencem à Classe dos Sacharomicetos, Filo Ascomicota, e, por ultimo, o único organismo do Filo Basidiomicota analisado (*C. pernicioso*), apresenta oito íntrons com um padrão de distribuição totalmente diferente dos demais.

Percebe-se, deste modo, que o padrão de conservação e variação nas posições de íntrons em genes ortólogos e parálogos pode ser útil na reconstrução de cenários da evolução da estrutura éxon-íntron de genes eucarióticos. Esta idéia tem se tornado ainda mais plausível com a disponibilidade e análise das seqüências de genomas eucarióticos inteiros, incluindo entre eles, o de diversas espécies de fungos. De fato, tem sido proposto que a fração das posições de íntrons que é compartilhada entre os organismos diminui com o aumento da distância evolutiva e, portanto, a conservação de íntrons pode funcionar com um excelente marcador filogenético (ROGOZIN et al., 2005; DUJON, 2006).



**Figura 4-** Análise comparativa da porção estrutural do gene *pacC/HIM101* de alguns fungos filamentosos e leveduras. As caixas abertas horizontalmente indicam a região estrutural do gene; as caixas menores, posicionadas verticalmente (preta, cinza e branca), representam os íntrons com tamanho e posição relativos ao gene de cada organismo analisado. No lado direito é mostrado o tamanho da proteína em resíduos de aminoácidos.

Embora os íntrons sejam objeto de estudo desde a sua descoberta, numerosas questões ainda permanecem com relação à sua origem, função e dinâmica evolutiva. Nesse contexto, os genes de fungos são particularmente ideais para se estudar os íntrons, por uma série de razões: primeiro, os aspectos fundamentais da biologia molecular dos íntrons são compartilhados entre fungos e eucariotos mais derivados, o que permite, portanto, a sua utilização como organismos modelo; segundo, os genomas de fungos apresentam uma densidade gênica alta e genes com estrutura molecular bem definida, o que facilita a predição e análise desses íntrons. Finalmente, os fungos apresentam uma ampla diversidade na densidade média de íntrons. Esta arquitetura diversa, acoplada com disponibilidade dos bancos de dados, fornece uma excelente oportunidade para investigar a dinâmica dos íntrons, e nos últimos anos, diversos trabalhos tem utilizado dessa estratégia (GALAGAN et al., 2005).

A ausência de íntrons no gene das duas leveduras analisadas (Figura 4), também constitui mais uma forte evidência da relação intrínseca entre íntrons e evolução de genomas eucariotos. Em leveduras apenas 5% dos genes que codificam proteínas apresentam íntrons, e desses, mais da metade são genes que codificam proteínas ribossomais. Uma hipótese recente assume que ao longo do processo evolutivo de leveduras, tenha ocorrido perda e aquisição de novos íntrons, mas a taxa de perda teria sido maior que a taxa de aquisição, de modo que o genoma perdesse a maioria dos seus íntrons. Essa hipótese ainda levanta uma nova teoria: a de que as leveduras não teriam surgido como eucariotos primitivos e sim como derivadas de um eucarioto superior, já que estes, incluindo muitos fungos filamentosos, apresentam vários íntrons no genoma (DUJON, 2006).

Como já foi mencionado, a Figura 3 mostra ainda a seqüência deduzida da proteína PacCl, a qual apresenta 581 resíduos de aminoácidos. O alinhamento da seqüência protéica obtida, com seqüências disponíveis nos bancos de dados mostrou que a proteína identificada apresenta altos valores de identidade e similaridade na composição de aminoácidos, com o regulador transcricional de resposta ao pH - PacC/Him101 - de fungos filamentosos e leveduras, respectivamente (Tabela 4).

A seqüência da proteína PacC de cinco dos organismos listados na Tabela 4 foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994), e o resultado é mostrado na Figura 5. Deve ser observado que algumas regiões são extremamente conservadas, como é o caso das regiões responsáveis pela formação dos três motivos dedo-de-zinco; do sinal de localização nuclear; do box de sinalização para protease, e dos sítios de ligação à proteína PalA, principalmente quando se considera as espécies do gênero *Colletotrichum* (as três primeiras, de cima para baixo).

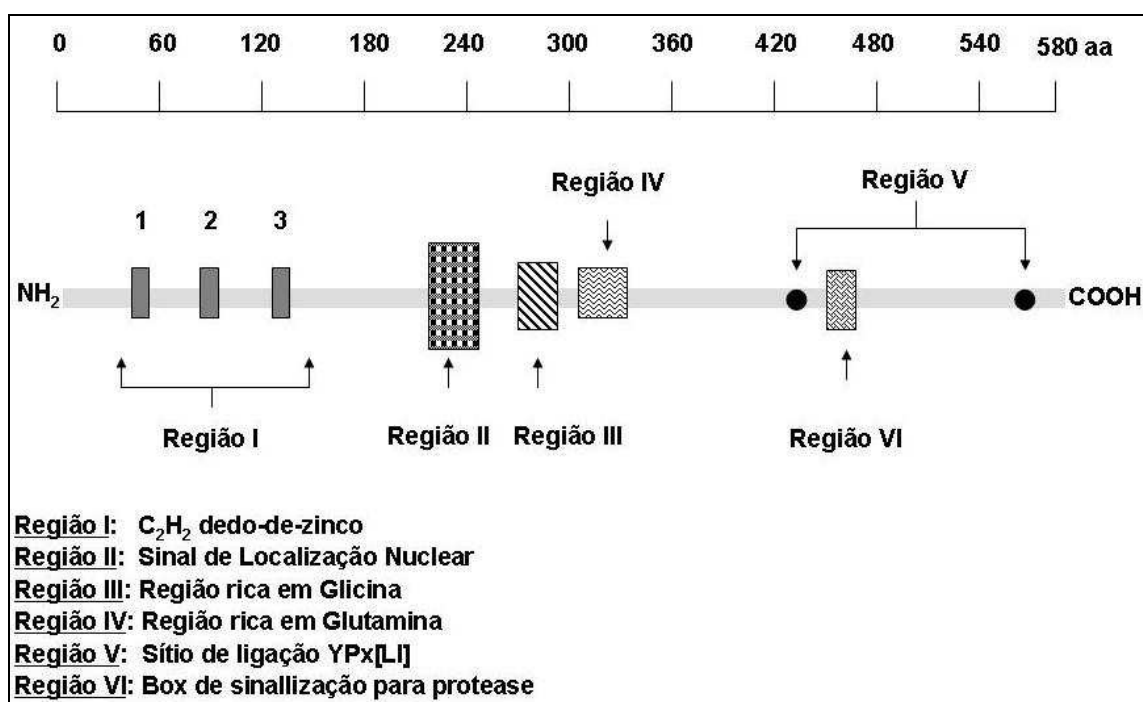
**Tabela 4 - Similaridade e identidade da proteína PacCl com seus ortólogos\* PacC/Him101**

<b>Organismo</b>	<b>N° acesso</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Similaridade (%)</b>
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	ACD56154	<b>87</b>	<b>89</b>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	ABL96218	<b>83</b>	<b>87</b>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Q870A3	<b>63</b>	<b>71</b>
<i>Gibberella moniliformis</i>	Q873X0	<b>63</b>	<b>71</b>
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Q8J1U9	<b>62</b>	<b>70</b>
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Q96X49	<b>59</b>	<b>68</b>
<i>Hypocrea lixii</i>	ABK60115	<b>54</b>	<b>63</b>
<i>Magnaporthe grisea</i>	Q52B93	<b>50</b>	<b>61</b>
<i>Neurospora crassa</i>	EAA27978	<b>49</b>	<b>58</b>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	AAF93178	<b>44</b>	<b>56</b>
<i>Aspergillus niger</i>	CAK37752	<b>42</b>	<b>56</b>
<i>Aspergillus nidulans</i>	EAA43726	<b>43</b>	<b>54</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CAA67927	<b>42</b>	<b>53</b>
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAB20756	<b>41</b>	<b>51</b>
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AAK98616	<b>41</b>	<b>52</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EDP52555	<b>40</b>	<b>51</b>
<i>Trichophyton rubrum</i>	AAK35072	<b>40</b>	<b>50</b>
<i>Aspergillus giganteus</i>	AAV28549	<b>41</b>	<b>50</b>
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AAN06812	<b>39</b>	<b>48</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CAP94266	<b>38</b>	<b>48</b>
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	EDN23717	<b>38</b>	<b>52</b>

\* Os organismos listados na tabela são os que apresentaram os maiores valores de identidade e similaridade após análise pela ferramenta Blastp.



Assim como na proteína PacC/Him101 de vários fungos, a análise do polipeptídeo obtido permitiu a identificação dos principais elementos que caracterizam essa família de proteínas (Figuras 3, 5 e 6). Na porção amino-terminal foram encontrados três motivos dedo-de-zinco, os quais são muito comuns em proteínas que apresentam domínios de interação proteína-DNA, como é o caso dos reguladores transcricionais. Na grande maioria dos casos, o motivo dedo-de-zinco apresenta a sequência consenso  $C(X_{2-4})C(X_{12})H(X_{3-5})H$ , ou seja, o aminoácido cisteína separado do outro resíduo de cisteína por dois a quatro resíduos de outros aminoácidos, e estes, separados das duas histidinas por mais doze resíduos de aminoácidos. O primeiro e o terceiro dedo-de-zinco encontrados se enquadraram exatamente nessas características, mas o segundo, ao invés de doze, apresentou oito resíduos de aminoácidos separando as duas extremidades do motivo. Os três motivos encontrados estão localizados na posição 44-67, 80-98 e 110-130, da escala adotada. Esses motivos estão destacados na Figura 3 pelo sombreado cinza na sequência de aminoácidos, sendo que os resíduos de cisteína (C) e histidina (H) estão sombreados em tom de cinza escuro. No alinhamento da Figura 5, os resíduos de cisteína e histidina estão marcados de preto. Semelhante ao que foi identificado na proteína PacC de *C. acutatum* (YOU et al., 2007) e *C. gloesporioides*, na posição 219-249 foi encontrado um sinal de localização nuclear - cuja sequência consenso é  $(K/R)_2-X_{10-12}-(K/R)_3$  (NIGG, 1997)- (Figura 5 e 6). Na porção mais central da proteína foram encontradas as regiões ricas em glicina e glutamina (Figura 6), assim como observado em outros organismos, tais como *A. nidulans* e *C. acutatum*, por exemplo. Mais adiante, já na porção carboxi-terminal, foram identificadas as duas sequências consenso YPNL e IPIL envolvidas no reconhecimento e ligação da proteína PalA, da cascata de sinalização, nas posições 430 e 574, respectivamente. Essas duas sequências estão flanqueando outra região bastante conservada, que é o box de sinalização para protease, localizado na posição 446-468 da sequência de aminoácidos. É nesse local onde ocorre a primeira clivagem proteolítica durante o processo de ativação da proteína PacC, sendo esta clivagem realizada pela proteína PalB. Todas essas regiões estão destacadas por sombreado cinza nas Figuras 3 e 5, e posicionadas numa escala relativa, na Figura 6.

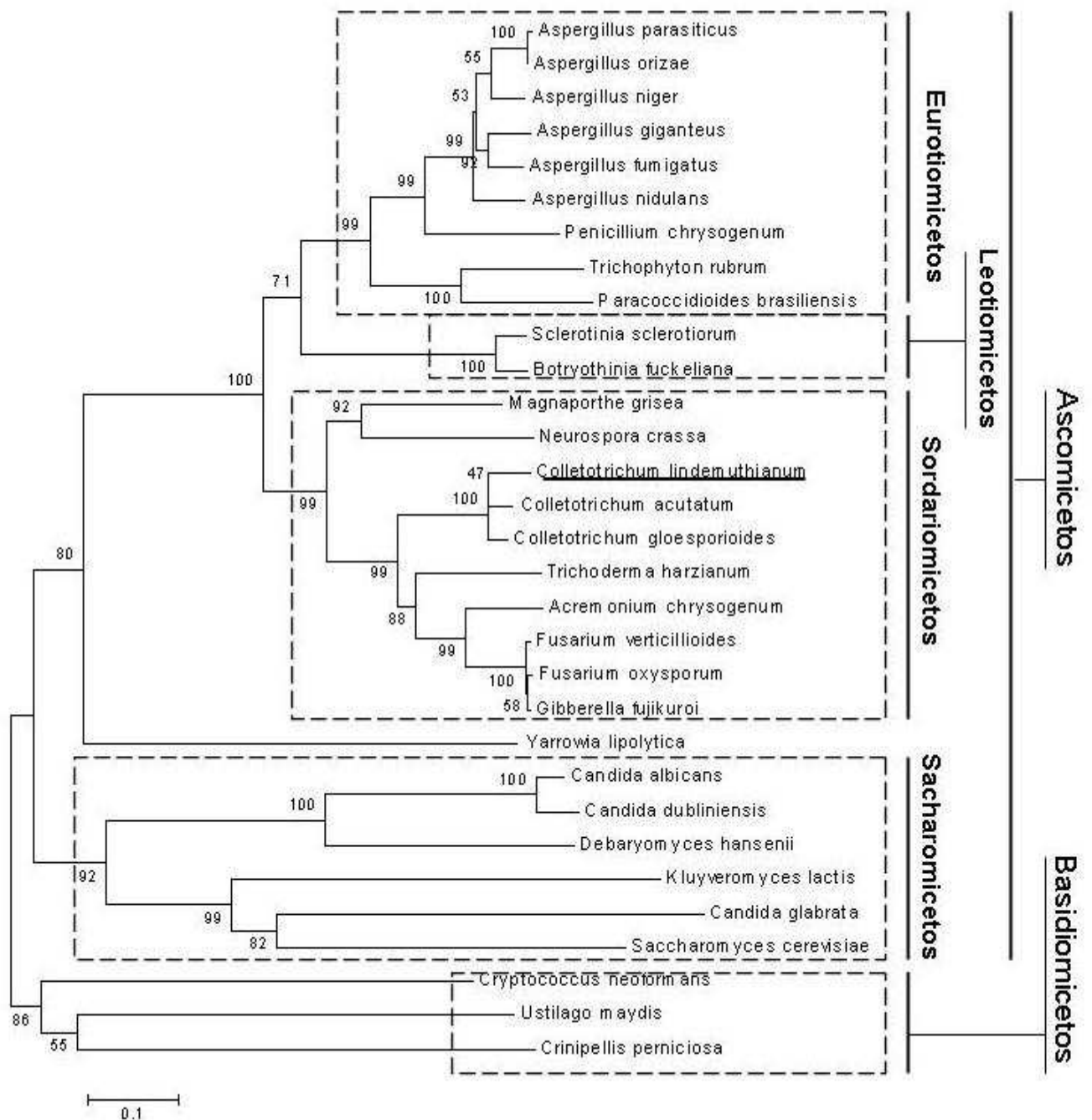


**Figura 6- Representação esquemática da proteína PacCI de *C. lindemuthianum*, mostrando os domínios e assinaturas potencialmente importantes para a configuração e função da proteína.** Note que o tamanho e a posição relativa da sequência de aminoácidos também é mostrada.

Com as sequências da proteína PacC/Him101, disponíveis nos bancos de dados do NCBI, foi feito um alinhamento utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994), e uma árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). Para a construção da árvore foram utilizadas as seqüências de 31 organismos, incluindo entre eles, fungos filamentosos e leveduras, pertencentes a Filo Basidiomicota e Ascomicota. O método de reconstrução filogenética utilizado foi o Neighbour joining, também conhecido como o método do vizinho mais próximo. A Figura 7 mostra a árvore filogenética consenso obtida, acrescida dos valores de bootstrap considerando 5000 replicações.

Como pode ser observado, os ramos da árvore foram bem sustentados, apresentando, na grande maioria dos clados, valores de bootstrap superiores a 95 %, o que a torna mais consistente e robusta. Percebe-se ainda, uma nítida separação entre as três espécies pertencentes ao Filo Basidiomicota (*U. maydis*, *C. perniciosus* e *C. neoformans*) - as quais se posicionaram nos ramos mais basais - das demais espécies pertencentes ao Filo Ascomicota.

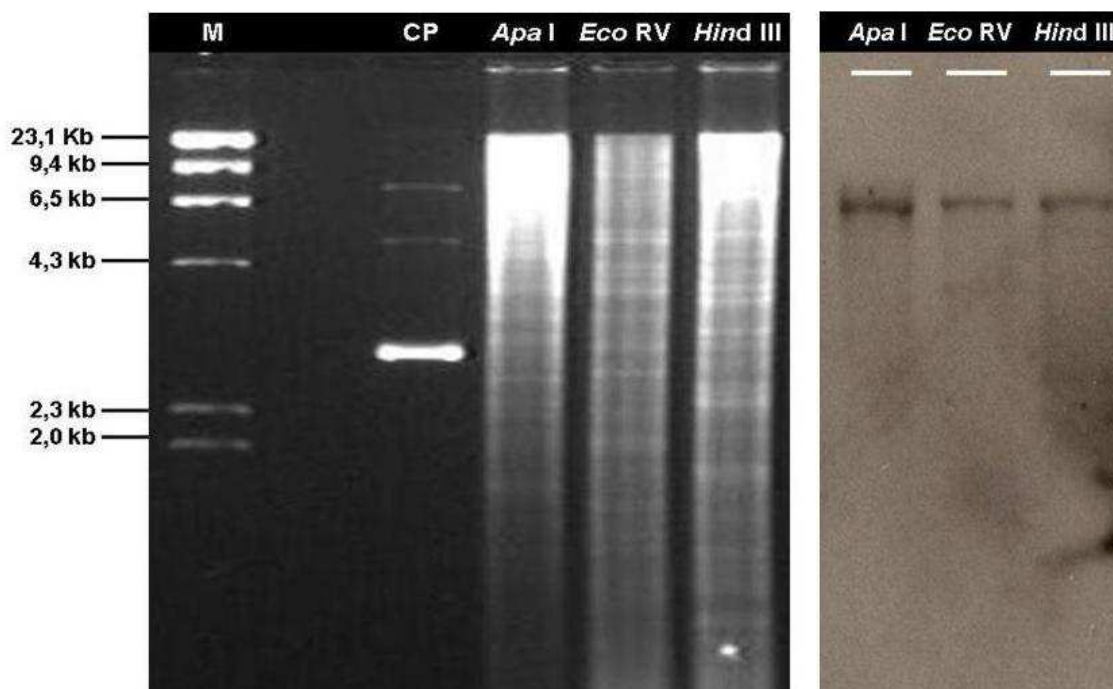
Interessantemente, a maioria dos cladogramas agrupa organismos taxonomicamente relacionados no nível de Classe. Como pode ser observado na parte superior da árvore, um grupo monofilético é formado pela Classe dos Eurotiomicetos, incluindo todas as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, e as espécies *P. chrysogenum*, *T. rubrum* e *P. brasiliensis*, sendo o grupo sustentado por um valor de bootstrap igual a 99. Logo abaixo as espécies *S. sclerotiorum* e *B. fuckeliana* se agrupam na classe dos Leotiomicetos, com valor de consistência igual a 100. Destaca-se ainda o monofiletismo da Classe dos Sordariomicetos, onde estão incluídas as três espécies de *Colletotrichum* analisadas (que inclusive também se agruparam em um único clado, suportado por um bootstrap igual a 100), além do gênero *Fusarium*, e as espécies *M. grisea*, *N. crassa*, *T. harzianum*, *A. chrysogenum*, e *G. fujikuroi* (a espécie *C. lindemuthianum* encontra-se sublinhada na árvore). Este clado foi suportado por um valor de consistência igual a 99. Por último, nos ramos mais basais, encontra-se a Classe dos Saccharomicetos, representada aqui por três espécies do gênero *Candida*, e as espécies *D. hansenii*, *K. lactis* e *S. Cerevisiae*. O resultado desta análise, além de nos mostrar o quanto a proteína PacC/Him101 apresenta-se conservada nos organismos estudados, evidencia o seu potencial como ferramenta de estudo para análises filogenéticas em fungos, podendo até mesmo ser útil na resolução de problemas pertinentes à classificação e taxonomia deste grupo de organismos, já que esta ainda permanece com falhas e muitas vezes apresenta-se confusa.



**Figura 7- Análise filogenética utilizando a seqüência da proteína PacC/Him101.** A árvore consenso foi construída utilizando o método Neighbour joining, com bootstrap de 5000 replicações, pelo programa MEGA 4.0. Para a análise foram utilizadas as seqüências de 31 organismos, incluindo entre eles fungos filamentosos e leveduras. Número de acesso genBank: *A. nidulans* (CAA87390); *A. niger* (Q00203); *A. fumigatus* (XP\_754424); *A. orizae* (BAB20756); *A. parasiticus* (Q96UW0); *A. giganteus* (Q5XL24); *P. chrysogenum* (Q01864); *S. cerevisiae* (NP\_011836); *C. albicans* (Q9UW14); *S. Sclerotiorum* (Q9P413); *A. chrysogenum* (Q96X49); *F. oxysporum* (Q870A3); *F. verticillioides* (Q873X0); *N. crassa* (Q7RVQ8); *C. glabrata* (Q6FV94); *D. hansenii* (Q6BSZ4); *K. Lactis* (XP-453982); *C. neoformans* (XP\_572292); *M. grisea* (Q52B93); *Y. lipolytica* (CAA67927); *C. acutatum* (ABL96218); *T. harzianum* (ABK60115); *B. Fuckeliana* (AAV54519); *C. dubliniensis* (Q873Y3); *G. fujikuroi* (Q8J1U9); *T. rubrum* (Q9C1A4); *U. maydis* (CAG34353); *C. gloesporioides* (ACD56154); *P. brasiliensis* (AAN06812); *C. perniciosa* (SILVA, 2006). A seqüência de *C. lindemuthianum* ainda não foi depositada.

#### 4.3- Determinação do número de cópias do gene *pacCl*, e caracterização molecular do mutante *pacCl* (Mutpac2)

Conforme descrito no tópico 3.6, para determinar o número de cópias do gene *pacCl* no genoma de *C. lindemuthianum*, foi utilizada a metodologia de hibridização de DNA, pela digestão do DNA genômico de *C. lindemuthianum* com três diferentes enzimas de restrição (*Apa*I, *Eco*RV e *Hind*III), as quais não clivam o gene *pacCl*. Após a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana e consequente hibridização, apenas uma banda positiva foi observada para cada digestão, confirmando que o gene *pacCl*, assim como o gene *pacC/HIM101* de todos os outros fungos filamentosos e leveduras que possuem o gene caracterizado, apresenta-se no genoma do fungo em uma única cópia. Como controle positivo da hibridização foi utilizado o plasmídeo pGpac31, descrito na seção 4.1, o qual contém o gene *pacCl*. A Figura 8 mostra o resultado da digestão do DNA total e da hibridização propriamente dita.

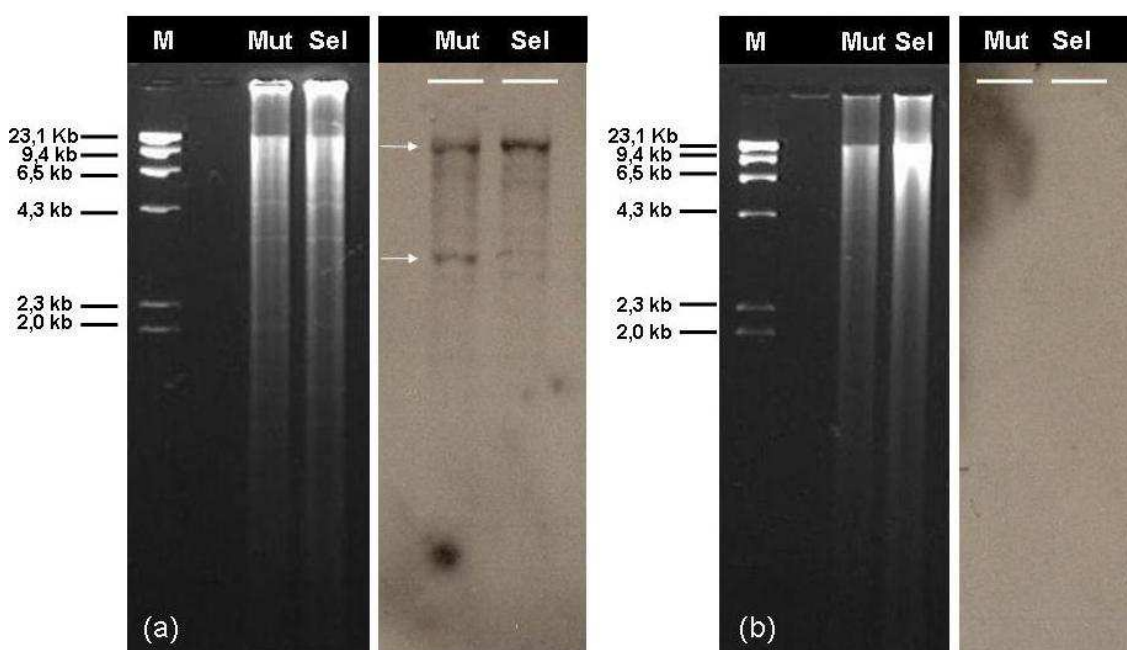


**Figura 8-** Análise do número de cópias do gene *pacCl*. O DNA genômico de *C. lindemuthianum*, raça fisiológica 89, foi digerido com as enzimas *Apa*I, *Eco*RV e *Hind*III, e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos para uma membrana de náilon, conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). Como sonda foi utilizado um fragmento de 1,8 kb referente ao gene *pacCl*, e a detecção dos fragmentos positivos foi realizada pelo uso do “*Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System*” (Amersham Biosciences®). (M)- DNA do bacteriófago Lambda digerido com a enzima *Hind*III. (CP)- Controle positivo - Plasmídeo pGpac31 contendo um fragmento do gene *pacCl*.

Entre as técnicas moleculares disponíveis para análise e confirmação de genes que codificam determinantes de patogenicidade, o isolamento e a caracterização de mutantes deficientes na patogenicidade apresentam um grande potencial. Se o gene de interesse já estiver identificado, uma estratégia para investigar sua função é interromper a sua expressão e determinar se o fenótipo foi alterado. Em fungos, a interrupção ou substituição de um gene alvo pode ser garantida por eventos de recombinação homóloga (WELD et al., 2006). De fato, como já foi descrito no tópico 2.4, para avaliar a contribuição do gene *pacCl* na patogenicidade de *C. lindemuthianum*, SOARES (2007) obteve um mutante *pacCl*, denominado Mutpac2, utilizando a técnica de mutagênese sítio-direcionada. Para isso, foi construído um vetor de inativação denominado pBKpac::hph2, contendo o cDNA do gene *pacCl* interrompido por um transposon, o qual, possui no seu interior, o gene *hph*, de *Escherichia coli*, que confere resistência à higromicina. O vetor foi introduzido no fungo e acredita-se que o gene *pacCl*<sup>+</sup> tenha sido substituído pelo gene interrompido (*pacCl*).

Para analisar e comprovar o padrão de integração do gene *pacCl*, na obtenção do mutante Mutpac2, também foi utilizada a metodologia de hibridização de DNA. Para essa análise, o DNA genômico da linhagem selvagem (raça fisiológica 81) e da linhagem mutante (Mutpac2), foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* e hibridizado utilizando duas diferentes sondas: um fragmento de 1.8 kb contendo o gene *pacCl* selvagem (Figura 9a), e o vetor de clonagem pBluescriptSK<sup>+</sup> (Figura 9b). Como já foi mostrado anteriormente (Figura 8), com o DNA da linhagem selvagem foi observada uma única banda, já que a sonda utilizada foi um fragmento do gene de interesse, que se encontra em uma única cópia no genoma. Já no caso do mutante Mutpac2 foram observadas duas bandas, positivas (Figura 9a). Quando a sonda utilizada foi o vetor de clonagem pBluescriptSK<sup>+</sup>, nenhuma banda positiva foi observada, tanto para a linhagem mutante quanto para a linhagem selvagem. Isto pode ser explicado pela estratégia utilizada na transformação e pelo vetor de inativação utilizado. Como foi utilizada a técnica de mutagênese sítio-dirigida, esperávamos que tivesse ocorrido recombinação homóloga, ou seja, uma recombinação entre gene *pacCl* contido no vetor de inativação e o gene selvagem contido no genoma de *C. lindemuthianum*. Além disso, como o vetor de inativação foi esquematizado de modo a conter o gene *pacCl* flanqueando uma região central contendo um transposon e o gene *hph* de *E. coli*, também esperávamos que ocorresse uma recombinação homóloga por troca gênica, de modo que nenhum resquício de vetor fosse encontrado no genoma do fungo. Por último,

também esperávamos que a hibridização com o gene *pacCl* apresentasse duas bandas na linhagem mutante, já que esse nova construção apresenta um sítio de restrição para a enzima *HindIII*. A Figura 9 mostra que esses objetivos foram alcançados com sucesso. Quando a membrana foi hibridizada com o gene *pacCl*, uma banda foi encontrada na linhagem selvagem e duas bandas na linhagem mutante, mostrando de fato que o gene selvagem havia sido substituído pelo gene alterado *pacCl*. Quando a mesma condição (DNA clivado com enzima *HindIII*) foi hibridizado com o vetor pBlueScriptSK<sup>+</sup>, ou seja, um vetor vazio, nenhuma banda foi observada na linhagem selvagem, o que demonstra que ocorreu recombinação homóloga por troca gênica (Figura 9).

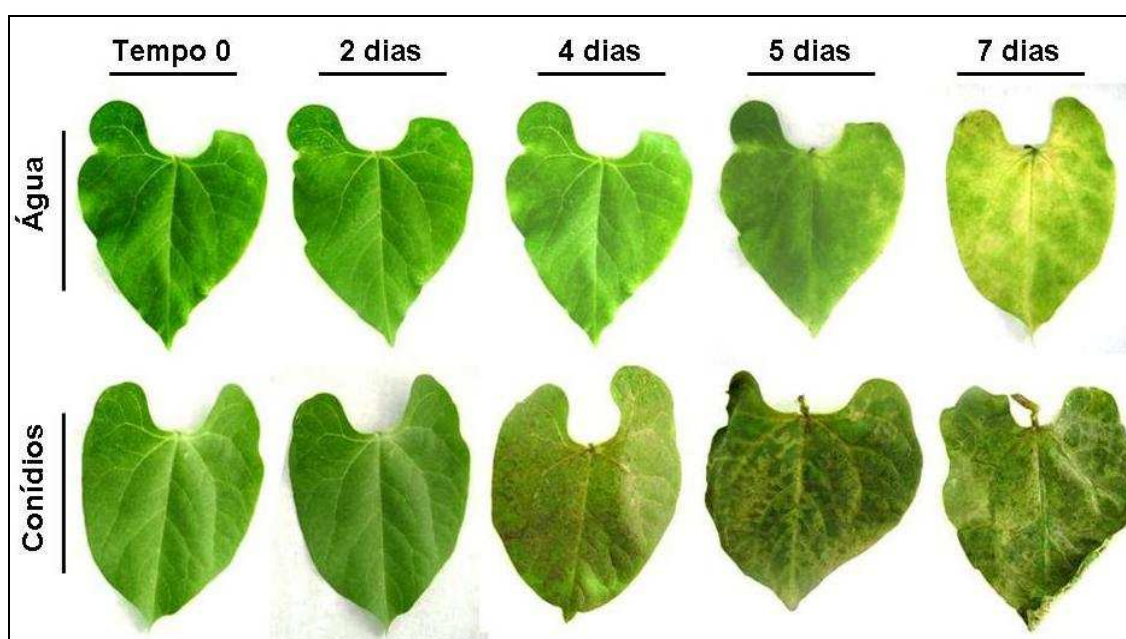


**Figura 10 - Caracterização molecular do mutante *pacCl*.** (a) Clivagem do DNA genômico da linhagem selvagem e mutante com a enzima de restrição *HindIII*, e hibridização utilizando como sonda um fragmento de 1,8 kb do gene *pacCl*. (b) Clivagem do DNA genômico da linhagem selvagem e mutante com a enzima de restrição *HindIII*, e hibridização utilizando como sonda o vetor de clonagem pBluescriptSK<sup>+</sup>. (M) DNA do bacteriófago Lambda digerido com a enzima *HindIII*; (Mut) Linhagem mutante Mutpac2; (Sel) Linhagem selvagem.

#### 4.4- Análise da expressão do gene *pacCl* por PCR Quantitativo em tempo real, durante a cinética de infecção

O estudo da função gênica requer condições para quantificar de forma confiável, padrões espaciais e temporais da expressão de um gene. Análises da expressão gênica realizadas por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (Q-PCR em tempo real) têm sido cada vez mais numerosas, representando uma de suas principais

aplicações. Conforme descrito no tópico 3.7, para avaliar o nível de expressão do gene *pacCl* nas diferentes etapas do ciclo infeccioso de *C. lindemuthianum*, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real. Para isto, folhas cotiledonares de plantas de feijão-comum crescidas por 10 dias, foram excisadas e inoculadas com  $10^6$  conídios de *C. lindemuthianum*, raça fisiológica 89. As folhas infectadas foram congeladas em diferentes intervalos de tempo de modo a recobrir o ciclo de infecção do fungo durante 7 dias. A figura 10 mostra o resultado da infecção das folhas de feijão-comum por *C. lindemuthianum*, em quatro diferentes tempos: Tempo 0; Tempo 1 (48 horas - 2 dias); Tempo 2 (96 horas - 4 dias); Tempo 3 (120 horas - 5 dias); Tempo 4 (144 horas - 6 dias) e Tempo 5 (168 horas - 7 dias).



**Figura 10-** Teste de patogenicidade de *C. lindemuthianum*.  $10^6$  conídios de *C. lindemuthianum*, raça fisiológica 89, foram inoculados em folhas de feijão-comum, incubadas à 22° C e fotografadas nos tempos mostrados. Como controle, 200  $\mu$ L de água estéril foram espalhados assepticamente na superfície de algumas folhas. O material foi congelado em intervalos regulares para subsequente extração de RNA total.

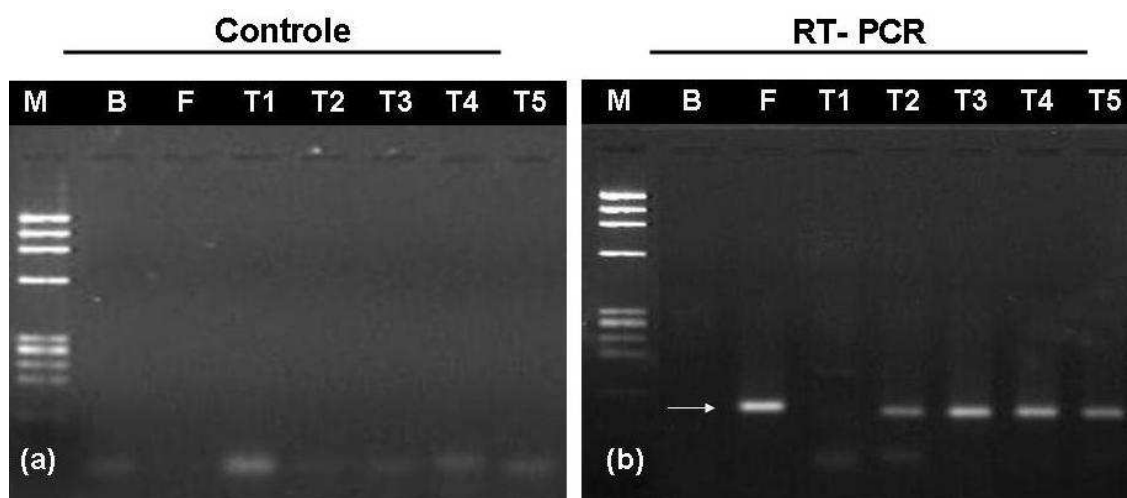
O tecido vegetal coletado, foi então utilizado para extração de RNA e síntese de cDNA conforme especificado no tópico nos tópicos 3.7.2 e 3.7.3. Com o cDNA obtido, foi realizado um RT-PCR. Esta metodologia nos permitiu confirmar, embora não quantitativamente, a expressão do gene *pacCl* nos diferentes tempos analisados. Além disso, esse RT-PCR comprovou a eficiência dos oligonucleotídeos desenhados, em amplificar especificamente um único fragmento de DNA, correspondente ao gene de interesse, condição esta necessária para a execução do PCR quantitativo em tempo real.

Para amplificar o gene *pacCl* de *C. lindemuthianum* foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos (Tabela 3). Um teste foi realizado com os dois pares de oligonucleotídeos, e apenas um deles (RtpacCl 3/RtpacCl 4) atingiu as características necessárias: um fragmento único de aproximadamente 100 pb. Este par de oligonucleotídeos, foi portanto, utilizado para o experimento de PCR em tempo real. Do mesmo modo, para escolha do gene a ser utilizado como controle endógeno, dois pares de oligonucleotídeos foram testados: um que amplifica parte do gene responsável pelo RNA 18S, e outro que amplifica parte do gene *gpdA*, que codifica a enzima gliceraldeído desidrogenase. O resultado obtido com o gene *gpdA* foi mais semelhante, em termos de intensidade da banda de DNA, ao do gene *pacCl* e, portanto, este foi escolhido para normalização do PCR em tempo real (dados não mostrados).

Para comprovar que a amplificação obtida nos experimentos foi decorrente da presença de cDNA do fungo, e não da contaminação das amostras de RNA total com DNA genômico do fungo, um RT-PCR controle foi realizado para cada amostra avaliada, porém, a partir de uma amostra que não havia sido tratada com a enzima transcriptase reversa. Esse controle negativo provou que as amostras de RNA total extraídas não estavam contaminadas com DNA genômico do fungo, já que não ocorreu nenhuma amplificação na reação de RT-PCR.

Como pode ser observado na Figura 11, os resultados esperados foram alcançados. No RT-PCR controle, nenhuma amostra apresentou amplificação, indicando que as amostras de RNA estavam livres de DNA genômico de *C. lindemuthianum*. (Figura 11a). Já na Figura 11b, um fragmento esperado de 100 pb foi visivelmente amplificado nas amostras correspondentes aos tempos 2, 3, 4 e 5, os quais correspondem aos intervalos de 4, 5, 6 e 7 dias de inoculação. Como já era de se esperar, a reação de PCR sem a enzima *taq* DNA polimerase não apresentou nenhum sinal de amplificação em ambos os experimentos (B). No tempo 1 (48 horas) não foi detectado nenhum sinal de amplificação, embora isso não signifique que o gene não seja expresso nessa condição, como será discutido mais à frente. Nos outros intervalos, observa-se claramente que o gene *pacCl* foi transcrito. Para utilizar como amostra referência no PCR em tempo real (calibrador), RNA total de micélio do fungo *C. lindemuthianum* (F) foi extraído utilizando os mesmos procedimentos utilizados na extração de RNA do tecido vegetal. Como pode ser observado na Figura 11b, também foi detectada expressão do gene *pacCl* pelo crescimento do fungo em meio de cultura líquido. Como essa técnica não apresenta um caráter quantitativo, nada se pode dizer,

ainda, sobre o nível de expressão do gene *pacCl* nessas condições, mas de qualquer forma, essa etapa foi de extrema importância para o estabelecimento dos parâmetros a serem utilizados na etapa subsequente: o PCR quantitativo em tempo real



**Figura 11- RT-PCR de amostras coletadas em diferentes etapas do ciclo de infecção de *C. lindemuthianum*.** (a) Controle negativo do RT-PCR - síntese de cDNA sem adição de transcriptase reversa - ausência de amplificação pela *taq* DNA polimerase. (b) RT-PCR mostrando a expressão do gene *pacCl* durante o ciclo de infecção de *C. lindemuthianum*. (M) DNA do bacteriófago  $\phi$ X174 digerido com a enzima *HaeIII*; (B) controle negativo da reação de PCR - sem adição de *taq* DNA polimerase; (F) RT-PCR utilizando RNA do fungo crescido em meio de cultura. (T1) Tempo 1 de inoculação: 2 dias; (T2) Tempo 2 de inoculação: 4 dias (T3) Tempo 3 de inoculação: 5 dias; (T4) Tempo 4 de inoculação: 6 dias e (T5) Tempo 5 de inoculação: 7 dias.

Para a técnica de PCR quantitativo foi utilizado o método de quantificação relativa por curva padrão. Neste método, uma curva padrão é primeiramente construída a partir de uma amostra de RNA com concentração conhecida. Esta curva é então utilizada como referência padrão para extrapolar informações quantitativas sobre o nível de expressão de um gene alvo, através de uma amostra de RNA com concentração desconhecida. A curva padrão para este experimento foi realizada com 7 pontos (diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-10}$ ), garantindo que todos os pontos apresentados pela amostra desconhecida fossem incluídos na curva. Como calibrador foi utilizado o RNA total extraído do fungo cultivado em meio de cultura líquido. Isto significa que todos os valores obtidos foram expressos como *n*-vezes o valor obtido para o calibrador. A amplificação do gene alvo foi normalizada com a amplificação do controle endógeno, para correção de variações de amplificação devido à quantidade de material inicial presente nas amostras, condições de processamento e presença de inibidores de PCR. Todas as reações foram amplificadas em triplicata.

Na Figura 12, o eixo x do gráfico representa o gene alvo (*pacCl*), nos diferentes estágios avaliados, e no eixo y, o seu nível de expressão relativo ao calibrador e normalizado com o controle endógeno *gpdA*. Com dois dias de infecção, ou seja, durante a fase biotrófica do ciclo de infecção do fungo, o gene *pacCl* foi 39,83 vezes mais expresso do que sob crescimento em meio de cultura, o que nos mostra, de fato, que a expressão desse gene é importante para o estabelecimento do processo de infecção do fungo, já no início do ciclo.

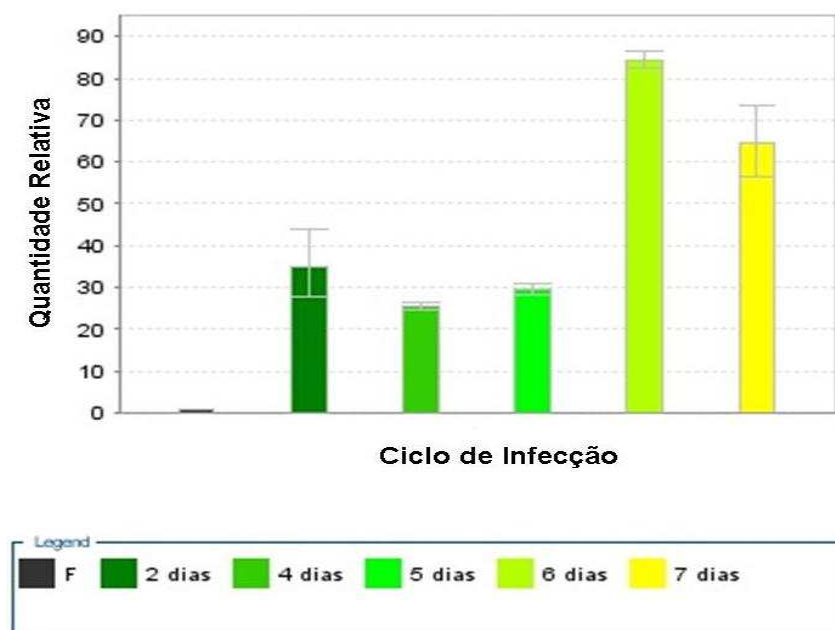
Como já foi amplamente discutido no referencial teórico, a proteína PacC atua como regulador transcricional de uma série de genes importantes (Tabela 1), o que pode explicar os altos níveis de expressão já nas fases iniciais do estabelecimento do doença. Além disso, de acordo com SOARES (2007), o pH apoplástico de folhas do cultivar susceptível “La Victoire” está em torno de 6,35. Isto significa que as condições ambientais favorecem a sua expressão, já que o gene *pacC* é expresso em valores de pH acima de 6.0 (PEÑALVA & ARST, 2002; ARST & PEÑALVA, 2003; PEÑALVA & ARST, 2004; PEÑALVA et al. 2008). É interessante lembrar que na Figura 12b, não foi observada expressão do gene *pacCl* nas amostras correspondentes ao Tempo 1 (2 dias). Isto mostra a alta sensibilidade da técnica de PCR em tempo real, e, mais do que isso, a dificuldade em se utilizar técnicas eletroforéticas para avaliar quantitativamente o nível de expressão de um determinado gene, sob uma determinada condição.

Com 4 e 5 dias de infecção, ou seja, no final da fase biotrófica e início da fase necrotrófica, o gene *pacCl* foi 26,4 e 30,6 vezes mais expresso do que na condição de calibração. Isto mostra que a expressão do gene continua sendo consideravelmente importante na interação do fungo com o hospedeiro, embora o nível de expressão tenha sido menor do que em 2 dias.

Com 6 e 7 dias de infecção (fase necrotrófica), o nível de expressão do gene *pacCl* aumentou consideravelmente: 85,7 e 62,3 vezes mais do que o calibrador. Analisando todos esses dados em conjunto, é possível inferir acerca da importância da expressão do gene durante a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica do ciclo de infecção de *C. lindemuthianum*, já que os níveis de expressão aumentam significativamente.

Como já foi mencionado, o aumento do pH do ambiente externo, pode alterar significativamente o controle da expressão gênica. De fato, a alcalinização do tecido vegetal é algo que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento de uma planta (PRUSKY et al., 2001). Entretanto, o aumento no pH do tecido hospedeiro pode ser

diretamente influenciado pelo patógeno. Trabalhos recentes relataram a capacidade de espécies de *Colletotrichum* (*C. gloesporioides*; *C. acutatum* e *C. coccodes*) em secretar amônia para o ambiente externo (tecido hospedeiro), aumentando o pH do tecido e, portanto, permitindo a expressão de genes ou ativação de proteínas que sejam importantes naquela condição (KRAMER-HAIMOVICH et al, 2006). Nesses trabalhos foi demonstrado que a alcalinização do tecido hospedeiro durante a infecção por *Colletotrichum* spp. é importante para sua transição de um estágio biotrófico quiescente, para um estágio necrotrófico colonizador do tecido vegetal. É provável que *C. lindemuthianum* também utilize desta estratégia durante o seu ciclo de infecção no tecido vegetal do feijão-comum. Neste caso, o aumento de pH ocasionado pela produção de amônia, seria responsável pelo aumento nos níveis de transcrição do gene *pacCl* durante a fase necrotrófica, o que garantiria um maior controle da expressão de outros genes necessários para completar o ciclo de infecção deste importante patógeno.



**Figura 12- Quantificação Relativa do nível de expressão do gene *pacCl* nas diferentes etapas do processo de infecção de *C. lindemuthianum*.** O nível de expressão do gene *pacCl* foi avaliado em 6 diferentes condições: (F) - Fungo crescido em meio de cultura líquido (calibrador); e cinco intervalos do ciclo de infecção, 2 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias e 7 dias.

## 5- CONCLUSÕES

A análise das sequências de nucleotídeos obtidas, a dedução da sequência de aminoácidos e o seu alinhamento com as sequências disponíveis nos bancos de dados, indicam que o gene isolado do banco genômico de *C. lindemuthianum*, identificado

como *pacCl*, codifica um regulador transcricional de resposta ao pH PacC/Him101. O gene *pacCl* apresenta três íntrons e uma ORF que codifica uma proteína de 581 resíduos de aminoácidos, com altos valores de identidade e similaridade à proteína PacC de outros fungos filamentosos, incluindo *C. gloesporioides* e *C. acutatum*. Além disso, a sequência da proteína PacCl e a presença/posição dos íntrons do gene analisado, se mostraram como bons marcadores filogenéticos para fungos, permitindo agrupar organismos taxonomicamente relacionados, no nível de Classe.

Assim como em outros fungos, a análise por hibridização de DNA revelou que o gene *pacCl* encontra-se no genoma de *C. lindemuthianum* em uma única cópia.

A análise por hibridização de DNA do mutante identificado como Mutpac2, revela que o gene *pacCl*<sup>+</sup> foi substituído pela construção de inativação, por meio de um evento de recombinação homóloga do tipo troca gênica.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi realizada com sucesso para avaliar o nível de expressão do gene *pacCl* durante o ciclo de infecção de *C. lindemuthianum*. Os resultados mostraram que ocorre alta expressão do gene, tanto na fase biotrófica quanto na fase necrotrófica, embora nesta última os níveis de expressão sejam mais elevados. Uma possível explicação para essa regulação, seria a elevação do pH do tecido vegetal ao longo do curso da infecção, sob efeito inclusive, do próprio patógeno, o que aumentaria os níveis de expressão do gene que é regulado por pH. Além disso, já é do nosso conhecimento que algumas espécies de *Colletotrichum* são capazes de elevar o pH do meio pela produção de amônia durante os estágios finais do ciclo de infecção.

A caracterização completa da região promotora poderá responder questões relacionadas à regulação da expressão do gene *pacCl*, inclusive, sobre a sua auto-regulação, como ocorre na grande maioria dos fungos. A compreensão geral do sistema PacC em *C. lindemuthianum*, assim como a identificação dos genes regulados por essa via, poderão ser úteis para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação deste patógeno com o seu hospedeiro, o que futuramente, será importante na elaboração de novos e eficientes métodos de controle desta importante doença que acomete a cultura do feijão-comum.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Milller, W. Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25 (1997) 3389-02.
- Amorim, L. Avaliação de doenças. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (eds.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. (1995) 647-671.
- Ansari, K. I.; Palacios, N.; Araya, C.; Langin, T.; Egan, D.; Doohan, F.M. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology*. 53 (2004) 635–642.
- Aréchiga-Carvajal, A. T.; Ruiz-Herrera, J. The *RIM101/pacC* homologue from basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryotic Cell* 4 (2005) 999-1008.
- Arst, H. N.; Peñalva, M.A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in Genetics*. 19 (2003) 224-231.
- Bailey, J. A.; Jeger, M. J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford (1992) 388p.
- Ballance, D. J. Important sequences for gene expression in filamentous fungi. *Yeast*. 2 (1986) 229-236.
- Balhadère, P. V.; Foster, A. J.; Talbot, N. J. Identification of pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12 (1999) 129-142.
- Barrus, M. F. Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose. *Phytopathology*. 1 (1911) 190-195.
- Benton, W. D.; Davis, R. W. Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*. 196 (1977) 180-183.
- Blanchin-Roland, S.; Cordero-Otero, R., and Gaillardin, C. Two upstream activation sequences control the expression of the *XPR2* gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 327–338.
- Bonett, L. P.; Schewe, I.; Silva, L. I. Variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean in western Paraná. *Scientia Agraria*. 9 (2008) 207-210.

- Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa (2005) 969p.
- Bos, L. Parleviliet, J. E. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. Annual Review Phytopathology. 33 (1995) 69-102.
- Brown, A. J. P., and Gow N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol. 7 (1999) 333–338.
- Brown, J. S. Holden, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. Current Opinion in Microbiology. 1 (1998) 390-394.
- Caddick, M.X.; Brownlee. A.G.; Arst, H.N. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. Molecular and General Genetics. 203 (1986) 346-353.
- Caracuel, Z.; Roncero, M.I.G.; Espeso, E.A.; González-Verdejo, C.I.; García-Maceira, F.I.; Pietro, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Molecular Microbiology 48 (2003a) 765-779.
- Caracuel, Z.; Casanova, C.; Roncero, M. I. G.; Di Pietro, A.; Ramos, J. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. Eukaryotic Cell. 2 (2003b) 1246-52.
- Casadevall, A.; Pirofski, A. Host-Pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infection and Immunity. 67 (1999) 3703-3713.
- Chaves, G. La antracnosis. In: Schwartz; H.F.; Galvez, G.E. (eds) Problemas de producción del frijol. Cali (1980) 37-53.
- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. Acesso em 09 de janeiro de 2009.
- Covert, S. F. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. Current Genetics. 33 (1998) 311-319.
- Damasceno e Silva, K. J.; de Souza, E. A.; Ishikawa, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brasil. Journal of Phytopathology. 155 (2007) 241-247.

- Davis, D.; Wilson, B.; Mitchell, A. P. *RIM101*- Dependent and Independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*. 20 (2000) 971-978.
- Dean, R. A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*. 434 (2005) 980-986.
- Denison, S. H. Review: pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 29 (2000) 61-71.
- Dufresne, M.; Bailey, J. A.; Michel, D.; Langin, T. *clk1*, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (1998) 99-108.
- Dufresne, M.; Perfect, S.; Pellier, A .L.; Bailey, J. A.; Langin, T. A GAI-4like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection processo of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell*.12 (2000) 1579-1589.
- Dujon, B. et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430 (2004) 35-44.
- Dujon, B. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. 22 (2006) 375-387.
- Elva, T.; Aréchiga-Carvajal; Ruiz-Herrera, J. The *HIM101/pacC* homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukariotic Cell*. 4 (2005) 999-1008.
- Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/>. Acesso em: 07 de janeiro de 2009.
- Espeso, E. A.; Arst, H.N., Jr. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Molecular Cell and Biology*. 20 (2000) 3355-3363.
- Flaherty, J. E.; Pirttila, A.;M. Bluhm, B.H.; Woloshuk, C.P. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (2003) 5222-5227.
- Foster, J. W.; Park, Y. K.; Bang, I. S.; Karem, K.; Betts, H.; Hall, H. K.; Shaw, E.. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* .140 (1994) 341– 352.

- Galagan, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 442 (2003) 859-868.
- Galagan, J. E.; Henn, M.R.; Ma, L.; Cuomo, C. A.; Birren, B. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Research*. 15 (2005) 1620-1631.
- Goffeau, A. et al. Life with 6000 Genes. *Science*. 274 (1996) 546-567.
- Gonzalez-Lopez, C. I.; Ortiz-Castellanos, L.; Ruiz-Herrera, J. The ambient pH response Rim pathway in *Yarrowia lipolytica*: identification of *YIRIM9* and characterization of its role in dimorphism. *Current Microbiology*. 53 (2006) 8-12.
- Gurr, S. J.; Unkles, S. E.; Kinghorn, J. R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*. Kinghorn, J.R. (ed.). (1987) Oxford: IRL Press, p. 93-139.
- Hervás-Aguilar, A.; Rodriguez, F. M.; Tilburn, J.; Arst, H. N.; Peñalva, M. A. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcriptional factor PacC. *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 34735-34747.
- Hurley, J. H.; Emr, S.D. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 35 (2006) 277-298.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 09 de janeiro de 2009.
- Idnurm, A.; Howlett, J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*. 2 (2001) 241-255.
- Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. *Gene (Amst.)* 96 (1990) 23-28.
- Jacobs, G. H.; Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *EMBO J.* 11(1992) 4507-4517.
- Kimati, H.; Gallii, F. *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld et v Schrenk f. sp. *phaseoli*, fase ascogena do agente causal da antracnose do feijoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*. 27 (1970) 411-437.
- Kirstler, H. C.; Miao, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Ann. Rev. Phytopatolology*. 30 (1992) 131-152.

- Kramer-Haimovich, H.; Servi, E.; Katan, T.; Rollins, J.; Okon, Y.; Prusky, D. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloesporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion and fruit Pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2006) 1034-1039.
- Lamb, T. M.; Xu, W.; Diamond, A.; Mitchel, A.P. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 1850-1856.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*. 25 (2001) 402-408.
- Loffus, B. J. et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. 307 (2005) 1321-1324.
- Lorens, M. C. Genomic approaches to fungal pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*. 5 (2002) 372-378.
- MacCabe, A.P.; Hombergh, P. T. W.; Tilburn, J.; Arst, H. Visser, J. Identification, cloning and analysis of the a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Molecular and General Genetics*. 250 (1996) 367-374.
- Moreno-Mateos, M.A.; Delgado-Jarana, J.; Codón, A.C.; Benítez, T. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genetics and Biology*. 44 (2007) 1355-1367.
- Niérman, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 438 (2005) 1151-1156.
- Nogueira, G. B. Isolamento do gene *pacC* e análise do mutante Pac02, do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (2007) 39p.
- Ochman, H.; Gerber, A. S.; Hartl, D. L. Genetic applications of an inverse polymerase Chain-Reaction. *Genetics*. 120 (1988) 621-623.
- O'Connell, R.; Perfect, S.; Hughes, B.; Carzaniga, R.; Bayley, J.; Green, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: Prusky, D.; Freeman, S. Dickman, M.B. *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. St. Paul-Minnesota, APS Pres. (2000) 57-77
- Oliver, R. Osbourn, A. Molecular dissection of fungal phytopatogenicity. *Microbiology*. 141 (1995), 1-9.

- Peñalva, M. A.; Arst, H. N. Jr Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (2002) 426-46.
- Peñalva, M. A.; Júnior, H. N. A. Recent avances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology*. 58 (2004) 425-451.
- Peñalva, M. A.; Tilburn, J.; Bignell, E. Arst, H.N. Ambient pH gene regulation in fungi: making connetions. *Trends in Microbiology*. 16 (2008) 291-300.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J.; Green, J. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interaction. *Fungal Genet. Biol.* 27 (1999) 186-198.
- 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 (1999) 17-34.
- Prusky, D.; McEvoy, J.; Leverentz, B.; Conway, W. S. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 14 (2001) 1105-1113.
- Rava, C. A.; Purchio, A. F.; Sartorato, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijão comum. *Fitopatologia Brasileira* 19 (1994) 167-72.
- Roca, M. G.; Davide, L. C.; Mendes-Costa, M. C. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology*. 40 (2003) 138-145.
- Rodriguez-Guera, R. M. T.; Ramirez-Rueda, et al. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology* 52 (2003) 228-235.
- Rogozin, I. B.; Sverdlov. V.; Babenko. V. N.; Koonin, V. Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. *Briefings in Bioinformatics*. 6 (2005) 118-134.
- Rollins, J. A.; The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interaction*.16 (2003) 785-95.

- Rollins, J. A.; Dickman, M. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/HIM101* homolog. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2001) 75-81.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–67.
- Schmitt, E. K.; Kempken, R.; Kück, U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Molecular Genetics and Genomics*. 265 (2001) 508-518.
- Schwartz, H. F. Antrachnose. In: Hall, R. Ed. *Compendium of Bean Diseases*. St. Paul, The American Phytological Society. (1991) 16-17.
- Shear, C. P.; Wood, A. K. Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella*. Department of agriculture Bureau of Plant Industry, Washington (1913) bulletin 252.
- Silva, K. J. D. Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG (2004) 86p.
- Silva, G. F. Clonagem e caracterização dos genes que codificam Endo-xilogalacturonana Hidrolase, o fator de transcrição PacC e a proteína PalA em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro (*Theobroma cacao*). Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (2007) 90p.
- Soanes, D. M.; Skinner, W.; Keon, J.; Hargreaves, J.; Talbot, N. J. Genomics of phytopathogenic fungi and development of bioinformatic resources. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15 (2002) 421-427.
- 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.
- Su, S. S.; Mitchell, A.P. Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIMI*. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3789–3797.

- Suárez, T., and Peñalva M. A.. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 529–540.
- Tamura, K.; Dudley J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24 (2007) 1596-1599.
- Thomas, S. R.; Elkinton, J. S. Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology.* 85 (2004) 146-151.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. and Arst, H. N., Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14 (1995) 779- 90.
- 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 (1994) 4673-4680.
- Vieira, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa (1988) 231p.
- Vieira, C.; Júnior, T. J. P.; Borém, A. Feijão, 2nd edn. Viçosa: Editora – UFV (2006).
- Vincze, T.; Posfai, J.; Roberts, R. J. NEBcutter : a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research.* 31 (2003) 3688-3691.
- Watson, N.; Duniak, D. S.; Rosey, E. L.; Slonszewski, J. L.; Olson, E. R. Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 530–540.
- Weld, R. J.; Plummer, K. M.; Carpenter, M.A.; Ridgway, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research.* 16 (2006) 31-44.
- You, B.; Choquer, M.; Chung, K. The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 20 (2007) 1149-1160.