

**ANDRÉIA CNOSSEN FASSONI**

**A PECTATO LIASE CODIFICADA PELO GENE *pecCl1* É IMPORTANTE  
PARA AGRESSIVIDADE DE *Colletotrichum lindemuthianum***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

Fassoni, Andréia Cnossen, 1986-

F249p  
2012

A pectato liase codificada pelo gene *pecCII* é importante  
para agressividade de *Colletotrichum lindemuthianum* /

Andréia Cnossen Fassoni. – Viçosa, MG, 2012.

viii, 38f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-37.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. Enzimas de fungos.  
3. Fungos fitopatogênicos. 4. Antracnose. 5. Feijão-comum -  
Doenças e pragas. 6. Mutação (Biologia). I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 576.549

**ANDRÉIA CNOSSEN FASSONI**

**A PECTATO LIASE CODIFICADA PELO GENE *pecCl1* É IMPORTANTE  
PARA AGRESSIVIDADE DE *Colletotrichum lindemuthianum***

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

APROVADA: 20 de julho de 2012.

---

Sérgio Hermínio Brommonschenkel

---

Janaína Aparecida Teixeira

---

Marisa Vieira de Queiroz  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Superior (CNPq) pela oportunidade e apoio financeiro.

À minha orientadora, Marisa Vieira de Queiroz, pela confiança, incentivo e todo aprendizado.

Às professoras Elza Fernandes de Araújo e Denise Mara Soares Bazzolli, pela co-orientação e ensinamentos.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, que contribuíram de diferentes formas para a realização deste trabalho.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, por aceitar prontamente o convite para compor a banca examinadora deste trabalho.

À doutora Janaina Aparecida Teixeira, pelas valiosas contribuições e pela participação na banca examinadora.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, pela convivência, amizade e por todo auxílio.

Às amigas, Glaucia e Sabrina, pela agradável e alegre companhia nas disciplinas e laboratório.

Aos meus pais, pela orientação de vida, amor, exemplo de fé, e incentivo.

Aos meus irmãos e familiares, pelo carinho e alegre torcida.

Ao meu marido, meu grande companheiro, pelo amor, paciência, incentivo, e seu precioso suporte matemático.

E, sobretudo, à Deus, pela presença constante em nossas vidas e por todas estas e muitas outras graças concedidas.

## **BIOGRAFIA**

Andréia Cnossen Fassoni, filha de Gerrit Cnossen e Dorotea Klemz Cnossen, nasceu em Unaí, Minas Gerais, no dia 08 de março de 1986. Em maio de 2006, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em de janeiro de 2010. Em agosto de 2010, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Genética de Micro-organismos, defendendo a dissertação em julho de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
2. A PECTATO LIASE CODIFICADA PELO GENE <i>PECCL1</i> É IMPORTANTE PARA AGRESSIVIDADE DE <i>COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM</i> .....	11
2.1 Resumo .....	11
2.2 Introdução.....	12
2.3 Resultados .....	13
2.4 Discussão .....	23
2.5 Material e Métodos.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
ANEXO .....	38

## RESUMO

FASSONI, Andréia Cnossen, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **A pectato liase codificada pelo gene *pecCl1* é importante para agressividade de *Colletotrichum lindemuthianum*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Elza Fernandes de Araújo.

*Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro comum. Genes que codificam enzimas que degradam a parede celular são essenciais para o desenvolvimento dessa doença. As pectinases são caracterizadas como o grupo de enzimas que hidrolisam a parede celular mais importante produzidas por fungos fitopatogênicos. O gene *pecCl1*, que codifica pectato liase, foi previamente identificado em uma biblioteca subtrativa supressiva de feijoeiro infectado com *C. lindemuthianum*. O isolamento do gene tornou possível a obtenção de mutantes e análise da regulação deste gene durante o desenvolvimento da antracnose, visando determinar se a pectato liase é um fator de patogenicidade. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi caracterizar estruturalmente e funcionalmente o gene que codifica pectato liase em *C. lindemuthianum*. Inicialmente, foi realizada a análise estrutural do gene *pecCl1*. A sequência completa de nucleotídeos do gene *pecCl1* foi depositada no Genbank com número de acesso JX270683. A análise da região promotora revelou alguns possíveis cis-elementos e sítios de ligação a fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica da pectato liase. A sequência de aminoácidos deduzida de *pecCl1* apresentou identidade de sequências com a pectato liase F de *Colletotrichum higginsianum* e a pectato liase C de *Glomerella graminicola* M1.001. Além disso, detectou-se um possível domínio conservado pfam03211 da superfamília de pectato liases. O gene *pecCl1* encontra-se representado por uma cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*. No entanto, no genoma de *Colletotrichum graminicola*, três sequências que codificam pectato liase apresentaram identidade de sequências com o gene *pecCl1* de *C. lindemuthianum*, e no genoma de *C. higginsianum* sete sequências que codificam pectato liase apresentaram identidade de sequências com o gene *pecCl1* de *C. lindemuthianum*, indicando que o genoma de *C. lindemuthianum* pode possuir além do gene *pecCl1* outros genes que codificam pectato liase. A análise filogenética de sequências de aminoácidos de pectato liases de fungos filamentosos mostrou a formação de dois grupos distintos, que se agruparam com base nos membros da família multigênica de pectato liases. A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *pecCl1* de *C. lindemuthianum*, possibilitando o estudo da função do

gene *pecC11*, em um mutante com integração específica e livre de integrações ectópicas. A inativação do gene *pecC11* não levou a perda completa da atividade de pectato liase, e conseqüentemente, somente diminuiu os sintomas de antracnose em seu hospedeiro, o que é consistente com a presença de outros genes que codificam pectato liase no fungo, permitindo ao patógeno uma maior flexibilidade em sua agressividade. Foi realizada a análise da expressão diferencial do gene *pecC11* por qPCR nos diferentes estágios de infecção no feijoeiro e foram observados transcritos de *pecC11* em todas as fases de desenvolvimento do fungo na planta, mas houve um aumento significativo destes transcritos cinco dias após a infecção, no início da fase necrotrófica do fungo. Nesta fase, as hifas secundárias causam degradação extensiva da parede celular vegetal por meio da secreção de vasta gama de despolimerases, dentre estas, a pectato liase. Portanto, a pectato liase codificada pelo gene *pecC11* é importante para agressividade de *C. lindemuthianum*. A análise de pectato liases poderá não somente auxiliar na compreensão da antracnose em feijoeiro comum, mas também poderá levar a descoberta de mais um alvo para o controle dessa doença.



## ABSTRACT

FASSONI, Andréia Cnossen, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **The pectate lyase encoded by the gene *pecCl1* is important for aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisors: Denise Mara Soares Bazzolli and Elza Fernandes de Araújo.

*Colletotrichum lindemuthianum* is the causal agent of common bean anthracnose. Genes that encode cell wall-degrading enzymes are essential for the development of this disease. The pectinases are characterized as the most important group of cell wall-degrading enzymes produced by phytopathogen fungi. The gene coding for pectate lyase, *pecCl1*, was previously identified in a suppressive subtractive library of bean infected with *C. lindemuthianum*. Isolation of the gene *pecCl1* made it possible to obtain mutants and to analyze the regulation of this gene during development of anthracnose, determining whether the pectate lyase is a pathogenic factor. Thus, the aim of our study was structurally and functionally characterize the gene encoding pectate lyase in *C. lindemuthianum*. Initially, was performed the structural analysis of the gene *pecCl1*. The complete nucleotide sequence of the gene *pecCl1* was deposited in Genbank with accession number JX270683. The analysis of the promoter region revealed some putative cis-elements and potential binding motifs of transcription factors involved in the regulation of pectate lyase gene expression. The deduced amino acid sequence of *pecCl1* showed sequence identity with the pectate lyase F of *Colletotrichum higginsianum* and the pectate lyase C of *Glomerella graminicola* M1.001. Furthermore, it was found putative conserved domain pfam03211 of the pectate lyases superfamily. The gene *pecCl1* is represented by a single copy in the *C. lindemuthianum* genome. However, into the genome of *Colletotrichum graminicola*, three sequences encoding pectate lyase showed sequence identity with the gene *pecCl1* of *C. lindemuthianum*, and into the genome of *C. higginsianum* seven sequences encoding pectate lyase showed sequence identity with the gene *pecCl1* of *C. lindemuthianum*, indicating that the *C. lindemuthianum* genome can possess other genes encoding pectate lyase. Phylogenetic analysis of pectate lyase amino acid sequences of filamentous fungi exhibited the formation of two distinct groups which are grouped on the basis of members of the pectate lyases multigene family. The *Split-Marker* technique was effective in *C. lindemuthianum* *pecCl1* gene inactivation, allowing the study of *pecCl1* function in a mutant by specific integrations and without ectopic integrations. The *pecCl1* gene inactivation did not lead to complete loss of the pectate

lyase activity, and consequently only decreased anthracnose symptoms in its host, which is consistent with the presence of other genes coding pectate lyase, allowing greater flexibility in pathogen aggressiveness. The analysis of differential expression of gene *pecC11* by qPCR was performed at different stages of bean infection and were observed expression levels of *pecC11* at all stages of development of the fungus in the plant, but a significant increase was observed five days after infection, in the onset of necrotrophic stage. At this stage, secondary hyphae cause extensive degradation of plant cell wall through the secretion of wide range of depolymerases, among these, the pectate lyase. Thus, the pectate lyase encoded by the gene *pecC11* is important to aggressiveness of *C. lindemuthianum*. The analysis of pectate lyases in *C. lindemuthianum* can not only assist in understanding the disease, but may also lead to discovery of one more target for disease control.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Colletotrichum* ssp. é um dos gêneros mais importantes de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, visto que praticamente todas as culturas agrícolas são susceptíveis a uma ou mais espécies (BAILEY e JEGER, 1992; DICKMAN, 2000). A antracnose é uma doença resultante da infecção de várias espécies de *Colletotrichum* em uma ampla gama de hospedeiros, entre eles, destaca-se o feijoeiro comum (GEFFROY et al. 1999, 2000).

Espécies de *Colletotrichum* possuem duas estratégias principais de infecção, a colonização intramural subcuticular e a colonização intracelular. Os estágios iniciais de infecção são muito semelhantes para ambos os grupos de patógenos. Conídios aderem e germinam na superfície das plantas, os tubos germinativos se desenvolvem e levam a formação de apressórios melanizados. Na maturação do apressório, forma-se um poro em sua superfície do qual desenvolve a hifa de penetração, que perfura diretamente a cutícula e a parede celular da epiderme da planta (BAILEY e JEGER, 1992; PERFECT et al., 1999).

Patógenos de colonização subcuticular intramural se desenvolvem sob a cutícula, formando uma rede de hifas. Hifas inter e intracelulares espalham-se rapidamente dentro das células epidérmicas do hospedeiro, que posteriormente morrem (BAILEY e JEGER, 1992; PERFECT et al., 1999).

A maioria das espécies de *Colletotrichum* exibe o segundo tipo de estratégia de infecção, a colonização intracelular. Nesses patógenos, após a penetração, a hifa incha dando origem à vesícula de infecção, que se expande formando a hifa primária, localizada entre a parede celular e a membrana plasmática da célula. Estas estruturas não matam a célula hospedeira, por isso, esta fase de infecção é chamada biotrófica. Aproximadamente, 120 horas após o início da infecção, são formadas as hifas secundárias, iniciando a fase necrotróficas. Hifas secundárias causam degradação extensiva da parede celular vegetal por uma vasta gama de enzimas secretadas, resultando na formação de lesões necróticas que, em estágios mais avançados, levam ao sintoma de antracnose (PERFECT et al., 1999; MÜNCH et al., 2008). Fungos que apresentam uma fase biotrófica seguida de uma fase necrotrófica são denominados hemibiotróficos.

O agente causal da antracnose no feijoeiro comum é um fungo filamentoso que apresenta duas fases reprodutivas, uma assexuada ou imperfeita, denominado de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib., e outra sexuada ou perfeita, denominado de *Glomerella cingulata* ((Stonem & V. Scherenk). Na fase sexuada, este fungo produz esporos sexuais dentro de um asco, que está localizado em corpos de frutificação chamados de peritécios. Já a fase assexuada de *C. lindemuthianum* é caracterizada pela produção de conídios em uma estrutura especializada denominada de acérvulo (BAILEY e JEGER, 1992).

*C. lindemuthianum* é encontrado predominantemente como um patógeno assexuado. Entretanto, estudos têm demonstrado níveis de desequilíbrio de ligação consistente com eventos de recombinação, sugerindo que a reprodução sexual possa ocorrer na natureza. Esse fato pode ser explicado pela baixa capacidade de dispersão de esporos e pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro. É provável que o ciclo sexual ocorra em algum estágio do desenvolvimento da patologia, resultando em uma expansão da variabilidade genética (SOUZA et al., 2010).

O fungo *C. lindemuthianum*, assim como outras espécies do gênero *Colletotrichum*, é considerado um fungo hemibiotrófico. Destaca-se como uma das espécies mais estudadas do gênero devido a sua estratégia de infecção, a facilidade com que pode ser cultivada *in vitro*, a disponibilidade de um sistema de transformação reprodutível e eficiente, e à sua importância econômica (PERFECT et al., 1999).

No Brasil, o feijão é considerado um componente essencial na dieta diária da população. É um produto que se destaca pela sua importância econômica e pela qualidade nutricional (MONTROYA et al., 2008; WANG et al., 2010). Apesar de nosso país ser o maior produtor mundial de feijão (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2010), seu rendimento na produção ainda é afetado por diversos fatores, entre eles, destacam-se o ataque de pragas e a incidência de doenças.

A antracnose é considerada uma das doenças mais severas do feijoeiro comum no Brasil, uma vez que pode ocorrer em toda parte aérea da planta e raramente nas raízes, e ao encontrar condições favoráveis, pode causar grandes danos na produção (RAVA, 2002). Essa doença caracteriza-se pela formação de lesões escuras sobre o tecido vegetal, e incide principalmente nas brotações jovens, ápices, folhas e ramos jovens (SCHWARTZ, 1991).

O controle da antracnose no feijoeiro comum pode ser realizado por meio do emprego de práticas culturais, do uso de produtos químicos, e em especial, a utilização

de cultivares resistentes (VIEIRA, 2006). Entretanto, uma das características mais importantes do patógeno é a sua ampla variabilidade genética, levando a ocorrência de diversas raças fisiológicas, dificultando assim, o uso, em longo prazo, de cultivares resistentes (SICARD et al., 1997; DAMASCENO e SILVA et al., 2007; BARCELOS et al., 2011).

A parede celular é considerada a primeira barreira estabelecida pelo hospedeiro para a infecção, colonização e disponibilização de nutrientes. Para degradar a parede celular, os fungos fitopatogênicos secretam numerosas enzimas extracelulares, entre elas, as enzimas pectinolíticas ou pectinases. Em *C. lindemuthianum* já foram encontradas as enzimas pectinolíticas, poligalacturonases (BARTHE et al., 1981); endopoligalacturonases (CENTIS et al., 1996; 1997; HERBERT et al., 2004) e pectina liases (WIJESUNDERA et al., 1984).

Enzimas pectinolíticas vêm sendo correlacionadas com a patogenicidade e virulência de alguns fungos fitopatogênicos. O complexo pectinolítico tem sido caracterizado como o grupo de enzimas que degradam a parede celular mais importante produzida por esses fungos. Entre as pectinases, a pectato liase é uma das enzimas cruciais na despolimerização da pectina (LEBEDA et al., 2001; REIGNAULT et al., 2008).

As pectinases além de degradar a pectina encontrada na lamela média e parede celular primária da maioria das plantas, estão envolvidas na penetração e colonização de plantas por fitopatógenos. A degradação enzimática da pectina enfraquece a parede celular e expõe seus demais componentes (REIGNAULT et al., 2008).

A pectina é composta de polissacarídeos formados por meio de longas cadeias de ácido D-galacturônico, ligados entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-4, e interespaçados por resíduos de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose ligados entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-2 (BENEN et al., 2000; JAYANI et al., 2005).

O complexo pectinolítico pode ser dividido em duas grandes classes, pectinesterases e despolimerases. As pectinesterases atuam sobre grupos metil e etil presentes na pectina. Já as despolimerases catalisam a clivagem das ligações glicosídicas por meio de hidrólise ou via-eliminação (VRIES et al., 2001).

As enzimas pectinolíticas podem também ser classificadas em hidrolases, liases e esterases, de acordo com o substrato e mecanismo de ação. As hidrolases incorporam uma molécula de água durante a clivagem das ligações glicosídicas entre os ácidos galacturônicos, já as liases clivam as ligações glicosídicas via reação de  $\beta$ -eliminação.

Por último, as esterases atuam sobre os grupos metil e etil presentes na pectina (BENEN et al., 2000).

A enzima pectina liase tem como substrato moléculas de pectina altamente esterificadas, enquanto pectato liases são específicas para moléculas de pectina com moderado grau de esterificação (BENEN et al. 2000). Outra característica que distingue pectina e pectato liase é o requerimento desta última por íons cálcio para sua atividade catalítica (SCAVETTA et al., 1999).

A enzima pectato liase (EC 4.2.2.2) catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido péctico de modo endo ou exo por transeliminção, requer  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade e tem pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 e 50 °C (UENOJO e PASTORE, 2007). As estruturas tridimensionais de pectato liase de diferentes micro-organismos já foram descritas, todas estas compartilham uma estrutura não usual, a “ $\beta$ -hélice paralela”, na qual fitas  $\beta$  são formadas em uma super-hélice voltada para direita (MARÍN-RODRÍGUEZ et al., 2002).

A fase necrotrófica de espécies de *Colletotrichum* tem sido estudada usando principalmente a interação *Colletotrichum*-feijoeiro. A necrotrofia está associada com o aumento da expressão de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como as endopoligalacturonases e pectina liases. Em estudos anteriores, observou-se o início da atividade de pectina liase com quatro dias após a inoculação de *C. lindemuthianum* em feijão, atingindo o máximo com sete dias de infecção (WIJESUNDERA et al., 1984; PERFECT et al., 1999).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos de abacate, produz uma ampla gama de enzimas pectinolíticas durante a colonização do tecido hospedeiro: endopoligalacturonase (PRUSKY et al., 1989; LI e GOODWIN, 2002), pectina liase A (TEMPLETON et al., 1994; BOWEN et al., 1995), pectina metil esterase (ORTEGA, 1996) e pectato liase (WATTAD et al., 1997; SHIH et al. 2000).

Os genes que codificam pectato liase (*pel-1* e *pel-2*) de *C. gloeosporioides* tiveram a expressão comparada durante a infecção necrotrófica. Apenas transcritos de *pel-2* foram detectados no início da fase necrotrófica, sugerindo que este gene está associado com a maceração dos tecidos, a qual ocorre no final da fase biotrófica (SHIH et al., 2000).

A pectato liase B de *C. gloeosporioides*, codificada pelo gene *pelB*, juntamente com a produção de amônia são considerados fatores de virulência durante a colonização dos frutos de abacate. A patogenicidade de *C. gloeosporioides* é dependente de sua

capacidade de secretar pectato liase em determinado pH (YAKOBY et al., 2000). A inativação do gene *pelB* via recombinação homóloga teve como consequência a redução na virulência em seu hospedeiro (YAKOBY et al., 2001). A presença do gene *pelB* também foi demonstrada em isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum sublineolum* (MEDEIROS et al., 2010).

No fungo hemibiotrófico *Colletotrichum graminicola* foram identificados vários genes de virulência por meio de mutação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, em que os mutantes obtidos revelaram uma redução significativa em sua virulência (MÜNCH et al., 2011). Com a obtenção de uma biblioteca de YSST (*Yeast Signal Sequence Trap*) foram detectadas várias proteínas secretadas, entre as peptidases, a pectato liase (KRIJGER et al., 2008).

Em *Colletotrichum coccodes*, o agente causal da antracnose em tomate, foi isolado o gene *pelA* que codifica uma pectato liase. A inativação desse gene resultou em uma agressividade reduzida em frutos de tomates, além de afetar a secreção e atividade extracelular da pectato liase. Em contraste, a superexpressão de *pelA* aumentou sua agressividade e secreção de pectato liase. Desta forma, sugere-se que o produto deste gene é um fator de virulência (BEN-DANIEL et al., 2011).

As enzimas pectinolíticas podem ser essenciais para a patogenicidade, no entanto, tem sido difícil comprovar isto em alguns fungos, pois certas enzimas são frequentemente codificadas por famílias multigênicas. Isto significa que a deleção de um gene pode não ter efeito na patogenicidade, visto que outros genes podem mascarar sua atividade (LEBEDA et al., 2001; REIGNAULT et al., 2008).

É importante para o controle da antracnose o conhecimento dos genes envolvidos em cada etapa do ciclo de vida do fungo. Recentemente, bibliotecas subtrativas da associação *Colletotrichum*-feijoeiro foram construídas e analisadas no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa. Entre os genes diferencialmente expressos, destacou-se um gene que codifica pectato liase, *pecC11*, identificado em folhas com sete dias de infecção (FONTENELLE, 2010).

Uma das melhores estratégias para identificar a função de um gene consiste na obtenção de mutantes. A técnica de *Split-marker* é uma estratégia de inativação do gene alvo por meio da inserção de um cassete contendo um marcador de seleção interrompendo o gene de interesse. Esta estratégia foi utilizada por CATLETT et al. (2003), demonstrando alta eficiência na inativação de numerosos genes em espécies

pertencentes ao filo Ascomycota. Além disso, a eficiência da técnica de *Split-marker* na prevenção de integrações ectópicas foi mostrada por YOU et al. (2009) com o fungo filamentoso *Cercospora nicotianae*. Deste modo, a técnica de *Split-marker* torna-se uma valiosa ferramenta no estudo da função do gene *pecC11* de *C. lindemuthianum*.

Com a sequência parcial obtida do gene *pecC11*, tornou-se possível o isolamento e caracterização da sequência completa deste gene, o que permite a obtenção de mutantes e uma análise da regulação deste gene durante o desenvolvimento da antracnose, a fim de determinar se a pectato liase é importante para a agressividade de *C. lindemuthianum*. A análise de pectato liases em *C. lindemuthianum* poderá não somente auxiliar na compreensão dessa doença, mas também poderá levar a descoberta de mais um alvo para o controle da antracnose no feijoeiro comum. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi caracterizar estruturalmente e funcionalmente o gene que codifica pectato liase em *C. lindemuthianum*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, 1992, 388p.
- BARCELOS, Q.L.; SOUZA, E.A.; DAMASCENO e SILVA K.J. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 230-242, 2011.
- BARTHE, J.P.; CANTENYS, D.; TOUZÉ, A. Purification and characterization of two polygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v.100, p.162-171, 1981.
- BEN-DANIEL, B.; BAR-ZVI, D.; TSROR (LAHKIM), L. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 1364-3703, 2011.
- BENEN, J.A.E.; KESTER, H.C.M.; PARENICOVÁ, L.; VISSER, J. Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. **Biochemistry**, v. 39, p. 15563-15569, 2000.
- BOWEN, K.J.; TEMPLETON, D.M.; SHARROCK, R.K.; CROWHURST, N.R.; RIKKERINK, E.H. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: Three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 196-205, 1995.
- CATLETT, N.L.; LEE, B.N.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genetics News**, v. 50, p. 9-11, 2003.
- CENTIS, S.; DUMAS, B.; FOURNIER, J.; MAROLDA, M.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Gene**, v. 170, p. 125-129, 1996.
- CENTIS, S.; GUILLAS, I.; SEJALON, N.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; DUMAS, B. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 769-775, 1997.
- DAMASCENO e SILVA, K.J.; SOUZA, E.A.; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 241-247, 2007.
- DICKMAN, M.B. (2000) *Colletotrichum*. In: Kronstad J.W. (Org.). **Fungal pathology**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000, cap.5, p. 127-148.
- FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; REYES-VARELA, V.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, C.; SALOMÓN-HERNÁNDEZ, G.; YÁÑEZ-MENESES, J.; CEBALLOS-RAMÍREZ, J.M.; DENDOOVEN, L. Effect of different nitrogen sources on plant characteristics

- and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 396-403, 2010.
- FONTENELLE, M.R. **Deteccão e análise de genes que são expressos na interação *Colletotrichum lindemuthianum-Phaseolus vulgaris***. 92 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- GEFFROY, V.; SICARD, D.; DE OLIVEIRA, J.C.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 774-784, 1999.
- GEFFROY, V.; SEVIGNAC, M.; DE OLIVEIRA, J.C.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; THOQUET, P.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; DRON, M. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and colocalization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 287-296, 2000.
- HERBERT, C.; O'CONNELL, R.; GAULIN, E.; SALESSES, V.; ESQUERRE-TUGAYE, M.T.; DUMAS, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 140-147, 2004.
- JAYANI, R.S.; SAXEN, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- KRIJGER, J.; HORBACH, R.; BEHR, M.; SCHWEIZER, P.; DEISING, H.B.; WIRSEL, S.G.R. The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 10, p. 1325-1336, 2008.
- LEBEDA, A.; LUHOVÁ, L.; SEDLÁROVÁ, M.; JANCOVA, D. The role of enzymes in plant-fungal pathogen interactions. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 108, p. 89-111, 2001.
- LI, J.; GOODWIN, P.H. Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*. **Journal of Phytopathology**, v. 150, p. 213-219, 2002.
- MARÍN-RODRÍGUEZ, M.C.; ORCHARD, J.; SEYMOUR, G.B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2115-2119, 2002.
- MEDEIROS, L.V.; MACIEL, D.B.; MEDEIROS, V.V.; HOULLOU KIDO, L.M.; OLIVEIRA, N.T. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 661-673, 2010.
- MONTOYA, C.A.; GOMEZ, A.S.; LALLE`S, J.P.; SOUFFRANT, W.B.; BEEBE, S.; LETERME, P. In vitro and in vivo protein hydrolysis of beans (*Phaseolus vulgaris*) genetically modified to express different phaseolin types. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1225-1233, 2008.

- MÜNCH, S.; LIGNER, U.; FLOSS, D.S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 41-51, 2008.
- MÜNCH, S.; LUDWIG, N.; FLOSS, D.S.; SUGUI, J.A.; KOSZUCKA, A.M.; VOLL, L.M.; SONNEWALD, U.; DEISING, A.H.B. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 43-55, 2011.
- ORTEGA, J. Pectolytic enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Texas Journal of Science**, v. 48, p. 123-128, 1996.
- PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.
- PRUSKY, D.; GOLD, S.; KEEN, N.T. Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35, p. 121-133, 1989.
- RAVA, C.A. Eficiência de fungicidas no controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 65-69, 2002.
- REIGNAULT, P.H.; VALETTE-COLLET, O.; BOCCARA, M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 1-11, 2008.
- SCAVETTA, R.D.; HERRON, S.R.; HOTCHKISS, A.T.; KITA, N.; KEEN, N.T.; BENEN, J.A.E.; KESTER, H.C.M.; VISSER, J.; JURNAK, F. Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. **The Plant Cell**. American Society of Plant Physiologists, v. 11, p. 1081-1092, 1999.
- SCHWARTZ, H.F. Anthracnose. In: Hall R, **Compendium of Bean Diseases**. St.Paul 1991, p. 16-17.
- SHIH, J.; WEI, Y.; GOODWIN, P.H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, v. 243, p. 139-150, 2000.
- SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of origin of its wild host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 87, p. 807-13, 1997.
- SOUZA, E.A.; CAMARGO Jr, A.O.; PINTO, J.M.A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, 2010.
- TEMPLETON, M.D.; SHARROCK, K.R.; BOWEN, J.K.; CROWHURST, R.N.; RIKKERINK, E.H. The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: characterization of *pnlA* and its expression in yeast. **Gene**, v. 142, p. 141-146, 1994.

- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 388-394, 2007.
- VIEIRA, C.; JÚNIOR, T.J.P.; BORÉM, A. **Feijão**. Editora - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2nd, 2006, 600p.
- VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.
- WANG, N.; HATCHER, D.W.; TYLER, R.T.; TOEWS, R.; GAWALKO, E.J. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, p. 589-594, 2010.
- WATTAD, C.; KOBILER, D.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 197-212, 1997.
- WIJESUNDERA, R.L.C.; BAILEY, J.A.; BYRDE, R.J.W. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 285-290, 1984.
- YAKOBY, N.; KOBILER, I.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1026-1030, 2000.
- YAKOBY, N.; BENO-MOUALEM, D.; KEEN, N.T.; DINOOR, A.; PINES, O.; PRUSKY, D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, p. 988-995, 2001.
- YOU, B.J.; LEE, M.H.; CHUNG, K.R. Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 615-622, 2009.

## 2. A PECTATO LIASE CODIFICADA PELO GENE *pecC11* É IMPORTANTE PARA AGRESSIVIDADE DE *Colletotrichum lindemuthianum*

### 2.1 Resumo

*Colletotrichum lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro comum. Genes que codificam enzimas que degradam a parede celular são essenciais para o desenvolvimento dessa doença. As pectinases são caracterizadas como o grupo mais importante de enzimas que degradam a parede celular produzidas por fungos fitopatogênicos. O gene *pecC11*, que codifica uma pectato liase, em *C. lindemuthianum* foi caracterizado estruturalmente e funcionalmente. Em sua região promotora foram detectados possíveis cis-elementos e sítios de ligação a fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica. O gene *pecC11* encontra-se representado por uma cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*. No entanto, análise *in silico* de genomas de *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum higginsianum* indicam que o genoma de *C. lindemuthianum* pode possuir além do gene *pecC11* outros genes que codificam pectato liase. A análise filogenética exibiu a formação de dois grupos distintos, que se agruparam com base nos membros da família de pectato liases. A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *pecC11*, possibilitando o seu estudo funcional em um mutante com integração específica. A inativação desse gene não levou a perda completa da atividade de pectato liase, mas diminuiu os sintomas de antracnose, o que é consistente com a presença de outros genes que codificam pectato liase no fungo. Com a análise da expressão diferencial de *pecC11* em diferentes estágios de infecção, detectou-se um aumento significativo da expressão após cinco dias de infecção, no início da fase necrotrófica. Portanto, a pectato liase codificada pelo gene *pecC11* é importante para agressividade de *C. lindemuthianum*. A análise de pectato liases poderá não somente auxiliar na compreensão da antracnose em feijoeiro comum, mas também poderá levar a descoberta de mais um alvo para o controle dessa doença.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum lindemuthianum*; pectato liase; fase necrotrófica; antracnose; *Split-marker*, patogenicidade.

## 2.2 Introdução

*Colletotrichum* ssp. é um dos gêneros mais comuns e importantes de fungos fitopatogênicos, que inclui várias espécies responsáveis por grandes prejuízos econômicos (Bailey e Jeger, 1992). O fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Geffroy *et al.*, 1999, 2000; Perfect *et al.*, 1999).

Como a antracnose pode levar a danos significativos na produção de feijão, diversas estratégias são utilizadas para o controle dessa doença, em especial, o uso de cultivares resistentes. No entanto, a variabilidade genética é uma das características mais importantes desse patógeno, o que dificulta o uso em longo prazo dessas cultivares resistentes (Barcelos *et al.*, 2011; Damasceno e Silva *et al.*, 2007; Sicard *et al.*, 1997).

A parede celular é considerada a primeira barreira estabelecida pelo hospedeiro para a infecção, colonização e disponibilização de nutrientes. Para degradar a parede celular, os fungos fitopatogênicos secretam numerosas enzimas extracelulares, entre elas, as enzimas pectinolíticas. Em *C. lindemuthianum* já foram encontradas as enzimas pectinolíticas, poligalacturonases (Barthe *et al.*, 1981); endopoligalacturonases (Centis *et al.*, 1996; 1997; Herbert *et al.*, 2004) e pectina liases (Wijesundera *et al.*, 1984).

A fase necrotrófica de espécies de *Colletotrichum* tem sido estudada usando principalmente a interação *Colletotrichum*-feijoeiro. A necrotrofia está associada com o aumento da expressão de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como as endopoligalacturonases e pectina liases (Münch *et al.*, 2008; Perfect *et al.*, 1999).

Com a obtenção de uma biblioteca de YSST (*Yeast Signal Sequence Trap*) no fungo hemibiotrófico *Colletotrichum graminicola* foram detectadas várias proteínas secretadas, entre as peptidases, a enzima pectato liase (Krijger *et al.*, 2008). Nesse patógeno já foram identificados vários genes de virulência por meio de mutação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, em que os mutantes obtidos revelaram uma redução significativa em sua virulência (Münch *et al.*, 2011).

Genes que codificam enzimas que degradam a parede celular são necessários para o desenvolvimento da antracnose. As pectinases são caracterizadas como o grupo de enzimas que degradam a parede celular mais importante produzido por fungos fitopatogênicos. Entre as pectinases, a pectato liase é uma das enzimas cruciais na despolimerização da pectina (Lebeda *et al.*, 2001; Reignault *et al.*, 2008).

É importante para o controle da antracnose o conhecimento dos genes envolvidos em cada etapa do ciclo de vida do fungo. Recentemente, bibliotecas

subtrativas da associação *Colletotrichum*-feijoeiro foram construídas e analisadas no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa. Entre os genes diferencialmente expressos, destacou-se um gene que codifica pectato liase, *pecC11*, identificado em folhas com sete dias de infecção (Fontenelle, 2010).

Com a sequência parcial obtida do gene *pecC11*, tornou-se possível o isolamento e caracterização da sequência completa deste gene, o que permite a obtenção de mutantes e uma análise da regulação deste gene durante o desenvolvimento da antracnose, a fim de determinar se a pectato liase é importante para a agressividade de *C. lindemuthianum*. A análise de pectato liases em *C. lindemuthianum* poderá não somente auxiliar na compreensão dessa doença, mas também poderá levar a descoberta de mais um alvo para o controle da antracnose no feijoeiro comum. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi caracterizar estruturalmente e funcionalmente o gene que codifica pectato liase em *C. lindemuthianum*.

## 2.3 Resultados

### Isolamento e caracterização estrutural do gene *pecC11*

Para obter a sequência completa do gene *pecC11* foi utilizado a técnica de PCR inverso. O produto de PCR inverso apresentou aproximadamente 1,7 kb. A sequência obtida do gene *pecC11* possui 494 nucleotídeos na região promotora, 981 nucleotídeos na região codificadora e 207 nucleotídeos na região terminadora. A análise da região promotora revelou alguns possíveis cis-elementos envolvidos na regulação da expressão gênica da pectato liase, TATA box na posição -109, CAAT box na posição -189 e -201, e regiões rica em C+T. Além disso, detectou-se possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição, como CreA na posição -244, AreA na posição -416 e AceI na posição -421. Cinco íntrons putativos foram encontrados interrompendo a região codificadora, e na região terminadora foram encontrados possíveis sítios de poliadenilação. Na sequência de aminoácidos deduzida foi encontrado um peptídeo sinal com a probabilidade de 0,994, que é clivado no sítio TLA-CL entre os aminoácidos 20 e 21 (Fig. 1). A sequência completa de nucleotídeos do gene *pecC11* foi depositada no Genbank com número de acesso JX270683.

A sequência de aminoácidos de *pecC11* apresentou identidade de sequências com a pectato liase F de *Colletotrichum higginsianum* (89% de identidade, número de acesso

```

-494      GATTACGCCAGTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACCGCTTG
-434      GGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAC TAGTGATTGCAACGTT
-374      TGCTTCATCTTGTTCATGTGAAACAAACTTGATTTTTTGAAGGATCAGGCATCTGATTG
-314      GACCGCATAAGCATCTGCGGTCTTGGTAGTATCGTGTGGGTTTGAGGATCCGGAGAT
-254      TCATGATGCGTGAAAATGCTGGCTGTGGGCTTTTTCGATGGCACAATGCTTCGATGTAA
-194      GTCCACCAATAGTGCCATGTCGACCGCGTGAGCGGAAGAGAGATTCAACCTGTCTCGT
-134      GGGCTCAACCCCGAGATGAGTATCTATATAAACTAAATGTCTTGAGGCCTTGACTCTCG
-74      CCATCAACCCCTCACTCACAGTCTTCAGCATCATCAGCAGCCCATCTCCCTAGCACAGTTT
-14      CGAGATCTTCATCATGTACTTCTCCAAGAGCTCCATCGTAGCTTTTCTGGCAGCTCTGC
1        M Y F S K S S I V A F L A A L
46      CTTCCACACTTGCCGTCTCGGATACGAGGGTGGTATTCTCTGTCGCCACCTCGACCAAGA
16      P S T L A C L G Y E G G I P A A T S T K
106     CCAACAGCAAGGTCAATCGAGGTCAAGGCCGAGAGGTTTACGACGGAGGATGGGCCCGCT
36      T N S K V I E V K A G E V Y D G G W A R
166     TCGACCGGAGTCCGGTGCCTGCAATGATCAAGCTGAAGGAGGtaagccattaatagttt
56      F D R E S G A C N D Q A E G
226     caagtcattgggaagaaaccggttgacctaacgaacgcagGCGACGCGGATGCTGTCTTTCT
70      G D A D A V F L
286     GCTTCGCCCGCGGCCACGCTGAAGAACGCCATCATCGGAAGAACCAGGCCGAGGGAGT
78      L R R G A T L K N A I I G K N Q A E G V
346     TCACTGCGACGGCCCTTGACCCCTGGAGTTTGTCTGGTTCGAGGACGTGTGCGAGGATGC
98      H C D G P C T L E F V W F E D V C E D A
406     CATCTCTGTGtgaagtcattcaggctgaccagaagcaagactcataaacccctgacacc
118     I S V
466     atacagaagAACGACAAGGCCGCGACCAACCTGGATCATCGGCGGTGGCGCTTACAAG
121     N D K A G D Q T W I I G G G A Y K
526     GCGTCGGACAAAATTGTCCAGCATAATGGTTGCGGTACCGTTAACTGtaagtcattaccgca
138     A S D K I V Q H N G C G T V N
586     cgcctcctaagggatcatgctgagtccttattcagATCATCGACTTCTACGCCAACGACTA
153     I I D F Y A N D Y
646     TGGCAAGCTCTACCGCTCTTGCAGCAACGtgaagtcattcagactcattctgctcatcatg
162     G K L Y R S C G N
706     ggtctctgaccgcttcaataacagTGCAGCAGCCAGTGAAGAGAAACGTATACGtagagg
171     C S S Q C K R N V Y
766     caagttcacatgtccgtatttatagatcacggttactaacggttcgggcagGGAACGACCG
181     G T T
826     CTTACAACGGTGGTGGAGATCGTCGGCATCAACTCCAACCTACGGCGACACGGCGACCCCTGA
184     A Y N G G E I V G I N S N Y G D T A T L
886     AGAACGTCTGCACCGACGCAAAAGTCAAGTCCAAATGTACAACGGCTGCGCGGGTGGCT
204     K N V C T D A K V S C Q M Y N G C A G G
946     GCGAGCCCAAGTCCGGCGTTTGTCTGGTTGAAGGTCGGTTGTCGGATACACCTTGAC
224     C E P T K S G V C S G *
1006    GACTGAGCAGATGACGAGATCCGGATGTGAGGCAGATGCCCATCATCAGCCCAAACCTC
1066    TGAATCGCTGATATGAACCTGAACAAAGTCTTTTGTACATAGTTTTTCTGCTGGAATGCT
1126    TCCAATCGAATTCCCGCGGCCATGGCGCGGGGAGCATGCGACGTGCGGCCAATCG
1186    CC

```

**Fig. 1** Sequência de nucleotídeos do gene que codifica pectato liase em *C. lindemuthianum* e a sequência de aminoácidos deduzida. Os possíveis CAAT box, TATAAAT box, sítios de ligação a fatores de transcrição (CreA - CCGGAG, AreA - GATA, AceI - AGGCA), sítios de poliadenilação (TAGT, TTT, CAWTS) estão sublinhados. As regiões ricas em C+T estão indicadas em linhas pontilhadas. O códon de terminação está marcado com um asterisco. O códon de iniciação, juntamente com a sequência consenso que o rodeia, está sublinhado em negrito. Os íntrons estão em letra minúscula. O sítio de clivagem do peptídeo sinal está destacado em cinza.



CCF40404.1) e com a pectato liase C de *Glomerella graminicola* M1.001 (83% de identidade, número de acesso EFQ27237.1). Além disso, detectou-se um possível domínio conservado pfam03211 da superfamília de pectato liases, entre os aminoácidos 20 a 228.

O gene *pecCl1* apresenta uma única cópia no genoma dos isolados das oito raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* analisadas, pois uma única banda específica foi constatada para os diferentes isolados quando foi utilizada enzima de restrição que não cliva dentro do gene e altas condições de estringência (Dados não mostrados).

No entanto, no genoma de *Colletotrichum graminicola*, três sequências que codificam pectato liase apresentaram identidade de sequências com o gene *pecCl1* de *C. lindemuthianum* (Tabela 1), e no genoma de *Colletotrichum higginsianum* sete sequências que codificam pectato liase apresentaram identidade de sequências com o gene *pecCl1* de *C. lindemuthianum* (Tabela 2), indicando que o genoma de *C. lindemuthianum* pode possuir além do gene *pecCl1* outros genes que codificam pectato liase.

**Tabela 1** Comparação da sequência nucleotídica de *pecCl1* de *C. lindemuthianum* com sequências de pectato liases de *C. graminicola*.

Nome do gene	Posição no genoma de <i>C. graminicola</i> <sup>a</sup>	Número de acesso no NCBI	Identidade de sequências
<i>pecCg1</i>	201656-202603	<i>Glomerella graminicola</i> M1.001 - EFQ27237.1	68%
<i>pecCg2</i>	30811-31635	<i>Glomerella graminicola</i> M1.001 - EFQ36566.1	74%
<i>pecCg3</i>	1385442-1386227	<i>Glomerella graminicola</i> M1.001 - EFQ25692.1	76%

<sup>a</sup> *Colletotrichum* database (Broad Institute, 2009).

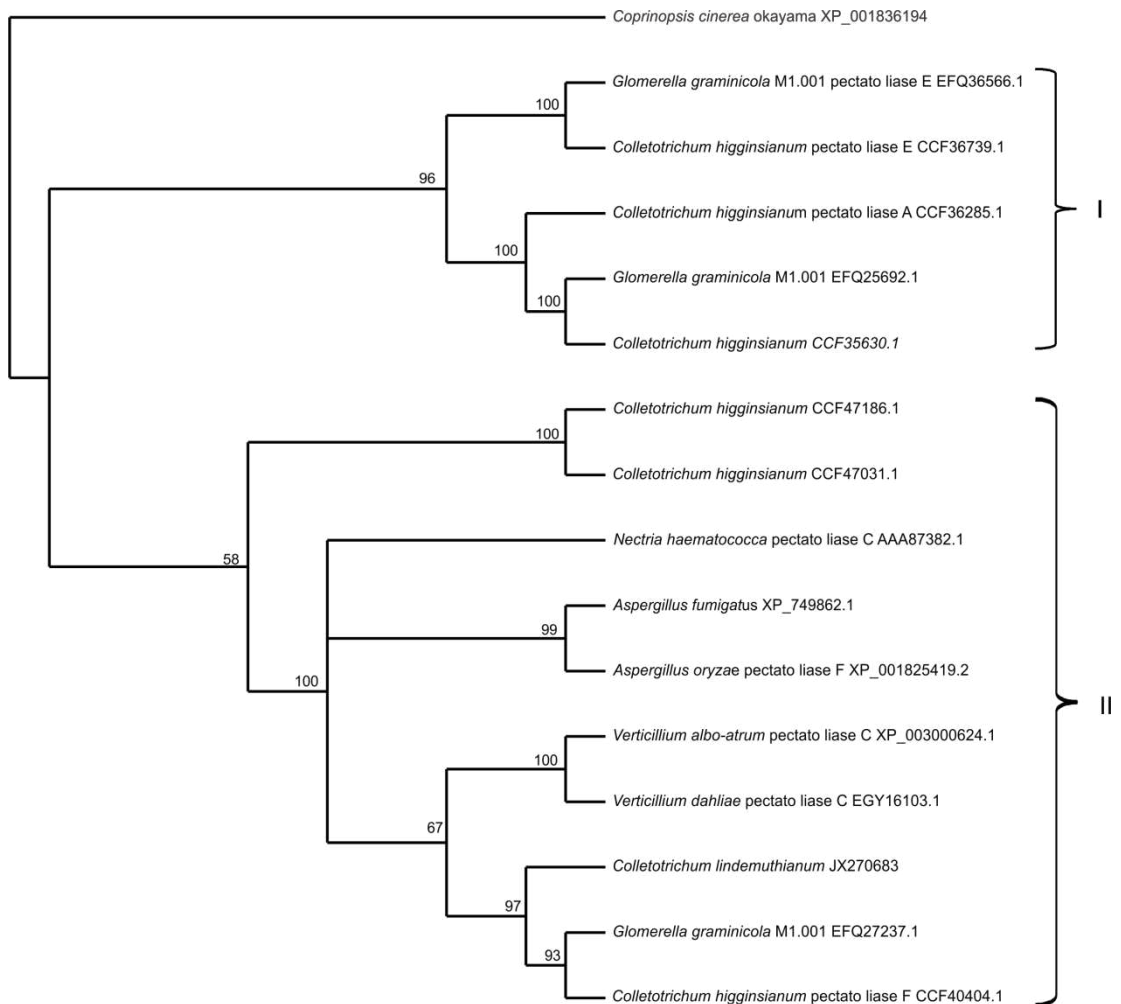
**Tabela 2** Comparação da sequência nucleotídica de *pecCl1* de *C. lindemuthianum* com sequências de pectato liases de *C. higginsianum*.

Nome do gene	Posição no genoma de <i>C. higginsianum</i> <sup>a</sup>	Número de acesso no NCBI	Identidade de sequências
<i>pecCh1</i>	1140-2119	<i>Colletotrichum higginsianum</i> pectato liase F - CCF40404.1	70%
<i>pecCh2</i>	2016-2631	<i>Colletotrichum higginsianum</i> pectato liase F - CCF43774.1	89%
<i>pecCh3</i>	4112-5366	<i>Colletotrichum higginsianum</i> - CCF47186.1	81%
<i>pecCh4</i>	1049-1666	<i>Colletotrichum higginsianum</i> - CCF47031.1	74%
<i>pecCh5</i>	3981-4944	<i>Colletotrichum higginsianum</i> - CCF35099.1	75%
<i>pecCh6</i>	644-1427	<i>Colletotrichum higginsianum</i> - CCF35630.1	97%
<i>pecCh7</i>	1817-2182	<i>Colletotrichum higginsianum</i> - CCF45327.1	79%

<sup>a</sup> *Colletotrichum* database (Broad Institute, 2009).

## Análise filogenética

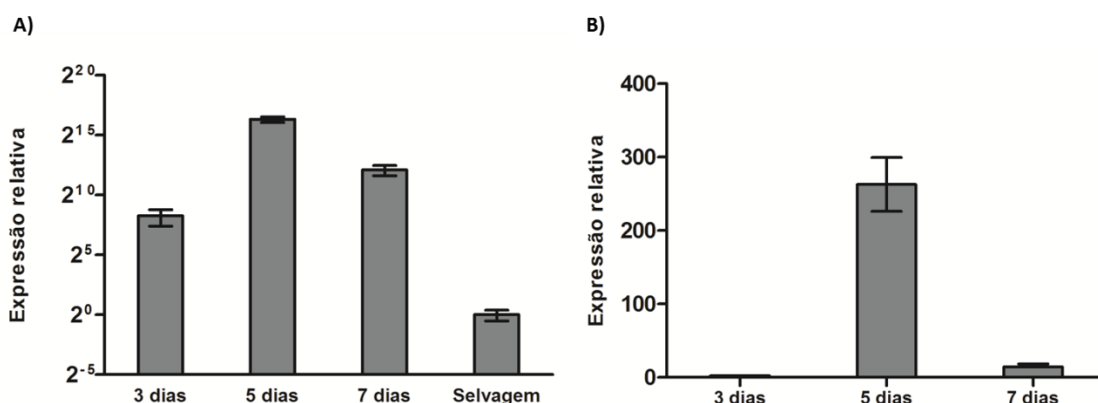
A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento de sequências de aminoácidos de pectato liases. Na Figura 2 é possível observar a ocorrência de dois grupos distintos, que se agruparam com base nos diferentes membros da família de pectato liases, sugerindo que tais pectato liases são significativamente diferentes em sua composição de aminoácidos. O clado I agrupou os membros das pectato liases A e E, e o clado II agrupou os membros das pectato liases C e F. A pectato liase de *C. lindemuthianum* agrupou no clado II, mais especificamente, com a pectato liase F de *C. higginsianum* (CCF40404.1) e com a pectato liase de *G. graminicola* M1.001 (EFQ27237.1).



**Fig. 2** Filogenia de sequências de aminoácidos de pectato liase de *Colletotrichum* ssp. A árvore enraizada com o fungo Basidiomycota *Coprinopsis cinerea* foi obtida pelo método de Máxima Parcimônia através do programa PAUP \* 4.0b10. Os números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de bootstrap, com base em 1.000 replicatas. O clado I agrupou os membros das pectato liases A e E, e o clado II agrupou os membros das pectato liases C e F.

## Expressão gênica

Ensaio de PCR em tempo real foi realizado para quantificar a expressão do gene *pecC11* em diferentes estágios de infecção do *C. lindemuthianum* em feijoeiro: 3 dias (fase biotrófica), 5 dias (início da fase necrotrófica) e 7 dias (final da fase necrotrófica). Na Figura 3A a amostra de cDNA do fungo foi utilizada como controle. E na Figura 3B a amostra de 3 dias de infecção foi utilizada como controle. A eficiência de amplificação dos genes *pecC11* e *rRNA* foram relativamente iguais, permitindo a utilização do método comparativo Ct para a quantificação relativa como descrito por Livak e Schmittgen, 2001. Transcritos de *pecC11* foram observados em todas as fases de desenvolvimento do fungo na planta, mas houve um aumento significativo destes transcritos cinco dias após a infecção, que corresponde ao início da fase necrotrófica do fungo.



**Fig. 3** Expressão relativa do gene *pecC11* na infecção do *C. lindemuthianum* em feijoeiro. A) A amostra de fungo foi utilizada como controle, e as amostras 3, 5 e 7 dias são as diferentes fases da infecção testadas. Os valores do eixo y estão na escala logarítmica de base 2. B) A amostra 3 dias de infecção foi utilizada como controle, e as amostras 5 e 7 dias são as diferentes fases da infecção testadas. Os valores do eixo y estão na escala linear.

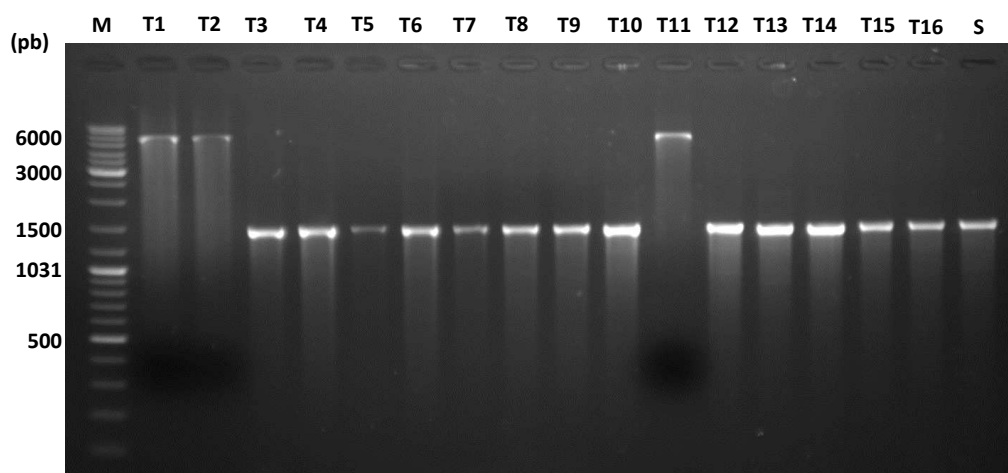
## Inativação do gene *pecC11*

A função do gene *pecC11* foi avaliada por meio da estratégia de inativação gênica denominada *Split-Marker*. A primeira rodada de PCR foi realizada utilizando-se o plasmídeo pAN7.1 como molde, e como produtos foram obtidos os fragmentos de DNA de 3101 e 1584 pb, amplificados pelos oligonucleotídeos M13R/NLC37 e M13F/NLC38, respectivamente. Ainda nesta primeira rodada, utilizando-se o DNA

genômico como molde, foram obtidos dois fragmentos de 608 e 659 pb, amplificados pelos oligonucleotídeos FP1/RP1 e FP2/RP2, respectivamente. A segunda rodada de PCR teve como produtos dois fragmentos de DNA com 3709 e 2243 pb que foram utilizados para transformação de protoplastos de *C. lindemuthianum*. Os fragmentos de DNA obtidos pela técnica de *Split-Marker* podem ser observados na Figura S1.

Após a transformação dos protoplastos de *C. lindemuthianum* com os cassetes de inativação construídos foi possível selecionar e purificar dezesseis transformantes.

A confirmação da interrupção gênica foi realizada pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos pecC1ForaF e pecC11ForaR (Fig. 4). De todos os transformantes analisados, apenas em três (T1, T2 e T11) foi identificado a ocorrência de integração gene-específica. A amplificação feita a partir do DNA genômico desses transformantes revelou um fragmento de DNA com 5730 pb, produto da junção das regiões flanqueadoras do gene *pecC11* com o gene que confere resistência à higromicina. Enquanto, o selvagem e os transformantes com integração ectópica apresentaram um fragmento de DNA com 1511 pb (que corresponde ao gene *pecC11*).

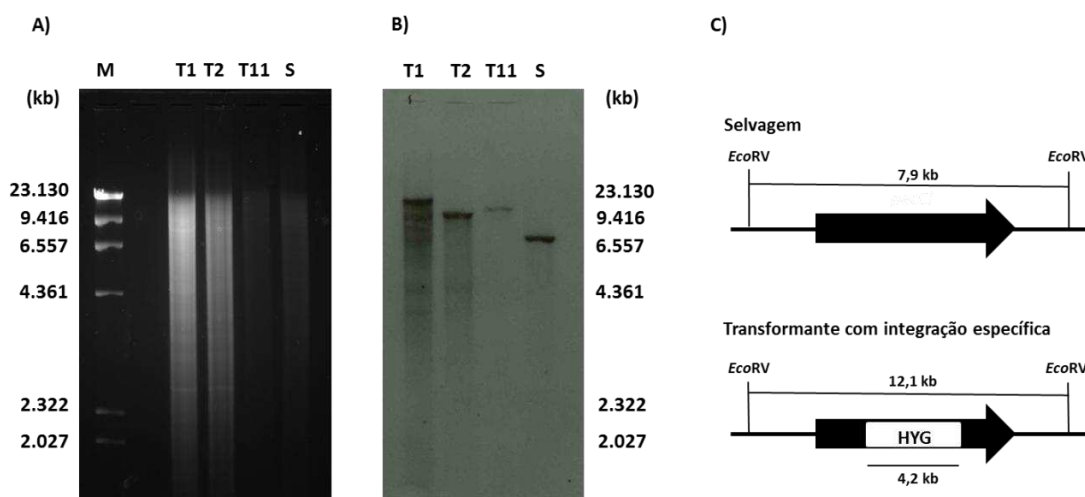


**Fig. 4** Confirmação da inativação do gene *pecC11*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do DNA genômico de *C. lindemuthianum* selvagem (S) e transformantes (T1 a T16) com oligonucleotídeos que anelam na região flanqueadora do gene *pecC11*. (M) Marcador O'GeneRuler™ Ladder Mix.

Uma caracterização molecular mais detalhada da integração dos fragmentos de DNA gerados por *Split-Marker* no genoma dos transformantes foi realizada por *Southern blotting*, utilizando-se como sonda um fragmento de DNA de 608 pb referente à porção inicial do gene *pecC11*. Esta análise foi realizada com os três transformantes

que tiveram a interrupção gênica confirmada. Na Figura 5, quando foi utilizada a enzima *EcoRV*, a qual não cliva dentro do gene *pecC11* e nem dentro do gene que confere resistência a higromicina, é possível verificar integrações específicas em todos os transformantes (T1, T2 e T11), pois o tamanho da banda relativa ao gene *pecC11* é maior que a do selvagem (S). No genoma do selvagem foi possível observar um fragmento de DNA de aproximadamente 7,9 kb. Enquanto os transformantes (T1, T2 e T11) apresentaram um fragmento com aproximadamente 16,8 kb, 12,1 kb e 14,8 kb, respectivamente. O transformante T2 revelou exatamente uma diferença de tamanho de 4,2 kb em relação ao gene presente no selvagem (S), o que corresponde ao tamanho do gene que confere resistência a higromicina. Já nos transformantes T1 e T11 essa diferença foi maior que 4,22 kb, sugerindo a ocorrência de rearranjos durante a recombinação.

Os resultados obtidos confirmam que o transformante T2, denominado  $\Delta pecC11$ , possui o gene *pecC11* inativado, apresentando a integração específica e nenhuma outra cópia adicional do cassete de inativação. Desta forma, o mutante  $\Delta pecC11$  pode ser utilizado para as análises de inferência funcional do gene.

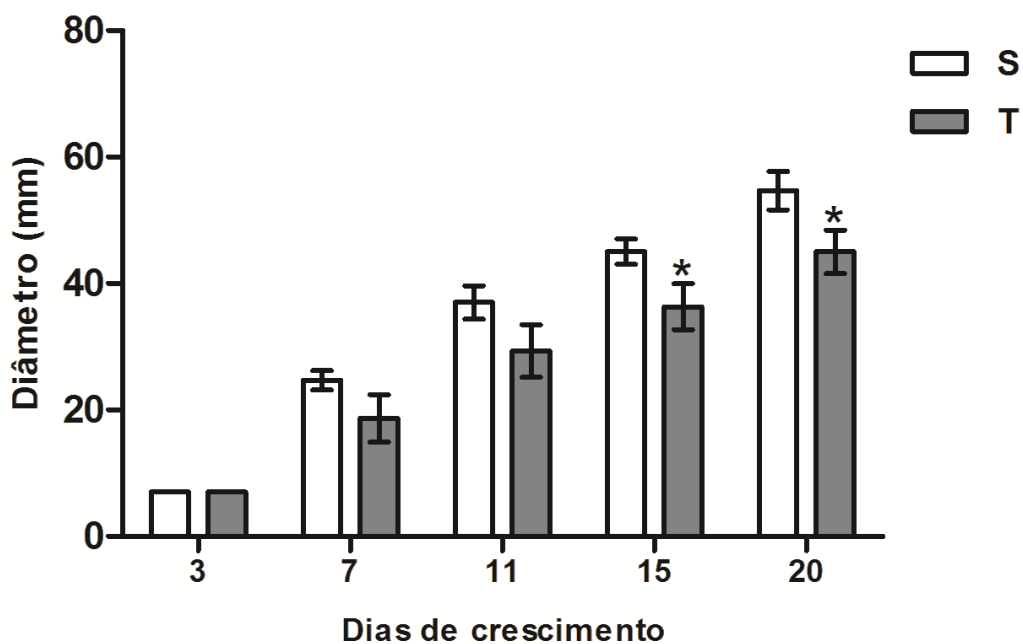


**Fig. 5.** Caracterização molecular dos transformantes. **A)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% das clivagens do DNA total de *C. lindemuthianum* selvagem (S) e transformantes (T1, T2 e T11) com a enzima *EcoRV*. (M) Marcador DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII*. **B)** Auto-radiografia da hibridização do DNA total de *C.lindemuthianum* selvagem (S) e transformantes (T1, T2 e T11) com a sonda de 608pb. **C)** Perfil de integrações específicas para o fungo selvagem e transformantes, e os tamanhos correspondentes esperados de DNA hibridizados.

### **Análise funcional do gene *pecC11***

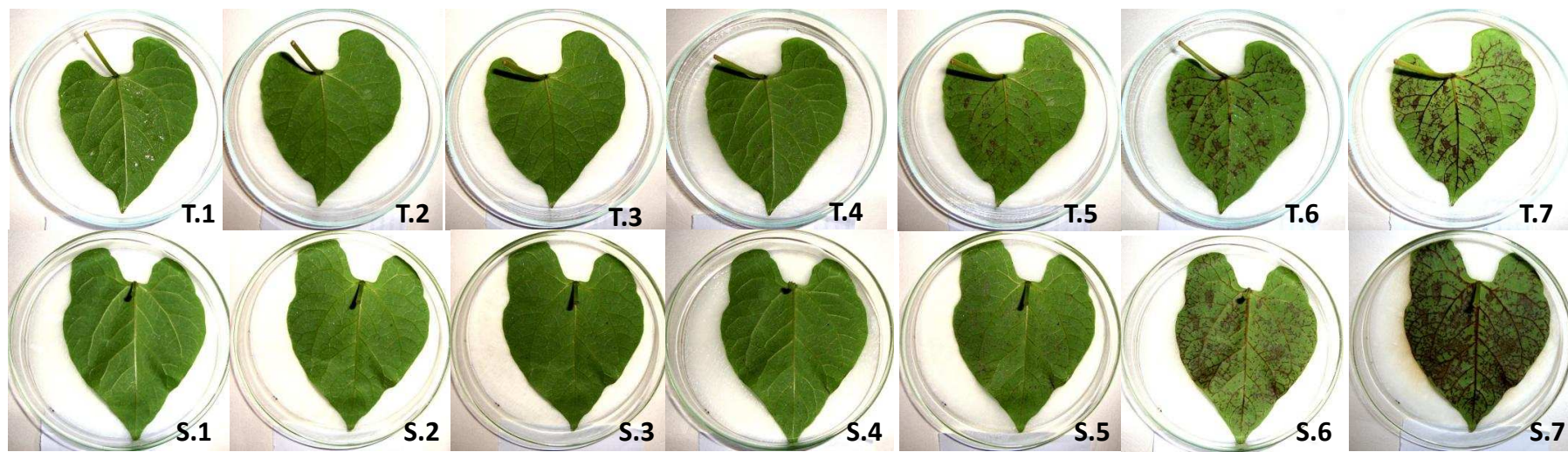
Observações macroscópicas da colônia do mutante  $\Delta pecC11$  não evidenciaram diferenças morfológicas entre este e a linhagem selvagem de *C. lindemuthianum*. A conidiação do mutante  $\Delta pecC11$  também indicou ser semelhante ao selvagem. Entretanto, em relação à taxa de crescimento observou-se uma redução significativa do crescimento micelial do mutante  $\Delta pecC11$  após 15 dias de repicagem (Fig. 6).

Para investigar a possível relação do gene *pecC11* com a patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum* raça 89A<sub>2</sub>2-3 em feijoeiro susceptível, conídios do transformante *pecC11* foram inoculados em folhas do cultivar de feijoeiro Rosinha, susceptível a antracnose, juntamente com o isolado selvagem como controle para a observação dos sintomas da doença. Assim como o isolado selvagem, no mutante a ocorrência de sintomas de antracnose na folha teve início a partir do quinto dia de infecção, o que é condizente com o início da fase necrotrófica. No entanto, as folhas inoculadas com os conídios do mutante  $\Delta pecC11$  apresentaram uma redução dos sintomas de antracnose, principalmente, no sétimo dia de inoculação. Foram observadas pequenas lesões a partir do quinto dia, porém elas não evoluíram na extensão da parte afetada e nem houve maceração do tecido, quando comparada com as folhas inoculadas com conídios do isolado selvagem (Fig. 7).



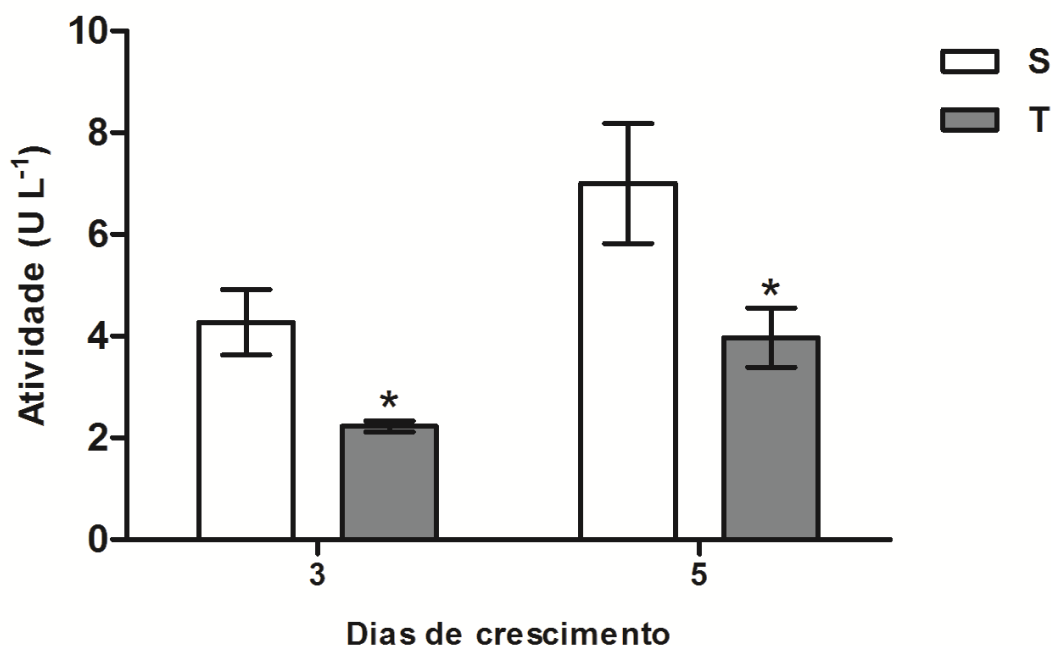
**Fig. 6** Análise do crescimento micelial do mutante  $\Delta pecC11$  (T). O selvagem (S) e o mutante  $\Delta pecC11$  (T) foram repicados em meio BDA. A média do diâmetro de crescimento de três placas foi utilizada para a construção do gráfico. \*A média é significativamente diferente ( $P < 0,01$ ) do selvagem pelo teste  $t$  de Student.

A fim de detectar a secreção da enzima pectato liase no mutante  $\Delta pecC11$  foi realizado ensaio enzimático com os sobrenadantes obtidos das linhagens selvagem e mutante com 3 e 5 dias de crescimento em meio líquido (Fig. 8). Em ambos os dias de crescimento foi observado uma redução significativa da atividade enzimática de pectato liase no mutante  $\Delta pecC11$ . Desta forma, o ensaio enzimático confirma que a diminuição dos sintomas de antracnose com os conídios do mutante  $\Delta pecC11$  ocorreu devido à redução da secreção da enzima pectato liase e não devido à um efeito secundário (Fig. 7 e 8).



**Fig. 7** Análise da patogenicidade de *C. lindemuthianum*. As letras e os números representam as linhagens selvagem (S) e mutante  $\Delta pecC11$  (T) e os dias após a inoculação em folhas destacadas de feijoeiro susceptível, respectivamente.





**Fig. 8** Atividade enzimática de pectato liase. O ensaio enzimático foi realizado com os sobrenadantes obtidos das linhagens selvagem (S) e mutante  $\Delta pecCl1$  (T) com 3 e 5 dias de crescimento em meio líquido. \*A média é significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) do selvagem pelo teste  $t$  de Student.

#### 2.4 Discussão

O gene *pecCl1* encontra-se representado por uma cópia única no genoma de *C. lindemuthianum*, semelhante ao que ocorre para os genes que codificam pectato liases, *pel-1* e *pel-2*, em *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Shih *et al.*, 2000). Entretanto, A produção de enzimas que degradam a parede celular é regulada principalmente a nível transcricional em fungos filamentosos. Os genes são induzidos na presença de polímeros ou moléculas derivadas, e reprimidos em condições de crescimento em que a produção destas enzimas não é necessária. A expressão gênica é regulada por vários fatores ambientais e celulares, alguns dos quais são comuns, enquanto outros são únicos para determinado fungo ou classe de enzimas (Aro *et al.*, 2005). Possíveis cis-elementos (TATA box, CAAT box) e sítios de ligação a fatores de transcrição (CreA, AreA e AceI) foram encontrados na região promotora de *pecCl1*.

O fator de transcrição CreA tem sido demonstrado estar envolvido com a repressão catabólica de várias pectinases (Aro *et al.*, 2005). Todavia, nem todas as pectinases são submetidas à repressão por glicose, como o gene *pelB* que codifica

pectato liase em *C. gloeosporioides*, que é ativado na presença de glicose (Miyara *et al.*, 2008). Em *Colletotrichum coccodes* foram encontrados quatro sítios de ligação a CreA na região promotora do gene que codifica pectato liase, *ccpelA*, entretanto, a pectato liase foi secretada na presença de glicose, indicando que os sítios de ligação encontrados podem estar em estado não-funcional (Ben-Daniel *et al.*, 2011).

Vários genes de fungos fitopatogênicos são ativados em condições de privação de nitrogênio. A regulação do metabolismo de nitrogênio em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* deve envolver fatores de transcrição da família GATA AreA e Nit2, respectivamente (Basse e Farfsing, 2006). Em *C. gloeosporioides*, a privação de nitrogênio ativa a transcrição de *areA*, e mutantes *nit* (que não podem utilizar nitrato) não são capazes de secretar pectato liase (Kramer-Haimovich *et al.*, 2006). Em *C. lindemuthianum*, mutantes de *clnr1* (homólogo de *areA*) não são patogênicos e são incapazes de mudar para a fase necrotrófica de infecção (Pellier *et al.*, 2003). Do mesmo modo, em *C. coccodes* os mutantes de *areA* e *nit* são prejudicados na secreção de amônia e demonstram virulência reduzida em seu hospedeiro (Alkan *et al.*, 2008). Além disso, a região promotora do gene que codifica pectato liase, *pelA*, foi comparada em dois isolados de *C. coccodes*, com agressividade média e alta, respectivamente. A diferença encontrada em seus promotores foi que apenas o isolado com agressividade alta possuía um sítio de ligação a AreA (Ben-Daniel *et al.*, 2011). Desta forma, o fator de transcrição AreA pode estar envolvido na agressividade fúngica e, portanto, *pecC11* pode ser um fator de virulência na patogenicidade de *C. lindemuthianum*.

O fator de transcrição AceI pode atuar como repressor da expressão gênica de genes que codificam enzimas que degradam a parede celular. Além disso, tem sido sugerido um papel de regulador geral, visto que a deleção de *aceI* causou uma redução no crescimento de *Trichoderma reesei* quando o sorbitol foi usado como única fonte de carbono (Aro *et al.*, 2002; 2005).

A enzima pectato liase encontrada na fase necrotrófica de *C. lindemuthianum* atua na degradação de pectina presente na parede celular da planta e está envolvida na penetração e colonização de plantas por fitopatógenos. A pectato liase é secretada pelo fungo para o meio extracelular onde atuará degradando a parede celular da planta. Essa secreção é direcionada por um peptídeo sinal presente na sequência de aminoácidos da pectato liase de *C. lindemuthianum*. De modo geral, as despolimerases de parede celular fornecem nutrientes e permitem o crescimento do fungo, sugerindo função mais em

nível nutricional do que específicas da infecção (Jia e Wheals, 2000; Münch *et al.*, 2008).

A análise filogenética demonstrou que os membros da família de pectato liases são significativamente diferentes em sua composição de aminoácidos. No entanto, são enzimas com múltiplas formas que catalisam essencialmente a mesma reação. Essas múltiplas isoenzimas podem ser devido a múltiplos genes de pectato liases. Adicionalmente, essas isoenzimas podem ser originadas a partir de modificações pós-traducionais dessas proteínas (Annis e Goodwin, 1997).

A técnica de *Split-Marker* mostrou-se eficiente na inativação do gene *pecC11* de *C. lindemuthianum*, possibilitando o estudo da função do gene *pecC11*, em um mutante com integração específica e livre de integrações ectópicas, embora tenha apresentado uma baixa eficiência de transformação e alguns transformantes com alto número de integrações ectópicas. As integrações ectópicas representam um problema, quando o objetivo é interromper um único gene, pois estas podem interferir no fenótipo do mutante. A eficiência da integração homóloga pode ser em função do mecanismo de recombinação homóloga da espécie estudada. A técnica de *Split-Marker* destaca-se como uma estratégia de inativação simples, rápida e de baixo custo, e vem sendo aplicada com sucesso em outros fungos filamentosos (Colot *et al.*, 2006; Gravelat *et al.*, 2012; You *et al.*, 2009).

O aparecimento macroscópico dos sintomas de antracnose nas folhas de feijoeiro a partir do quinto dia de infecção de *C. lindemuthianum* indica o desenvolvimento de hifas secundárias nesse período, as quais secretam enzimas pectinolíticas que degradam a parede celular conforme vão avançando. Isso leva a formação de lesões necrotróficas que, em estágios mais avançados, levam a um sintoma de antracnose (Perfect *et al.*, 1999, Münch *et al.*, 2008).

Estudos realizados com *Fusarium solani* f. sp. *pisi* sugerem que somente duas das quatro pectato liases encontradas são essenciais para a patogenicidade do fungo (Rogers *et al.*, 2000). Em *C. gloesporioides*, a inativação do gene que codifica pectato liase, *pelB*, teve como consequência uma menor atividade enzimática e redução de aproximadamente 40% da severidade da doença em frutos de abacate (Yakoby *et al.*, 2001). De modo semelhante, em *C. coccodes*, a inativação do gene que codifica pectato liase, *pelA*, resultou em uma agressividade reduzida (20 - 25%) em frutos de tomates, além de afetar a secreção e atividade extracelular de pectato liase (Ben-Daniel *et al.*, 2011).

As enzimas pectinolíticas podem ser importantes para agressividade de *C. lindemuthianum*, no entanto, tem sido difícil comprovar isto em alguns fungos, pois certas enzimas são frequentemente codificadas por famílias multigênicas. Isto significa que a deleção de um gene pode não ter efeito na patogenicidade, visto que outros genes podem mascarar sua atividade (Lebeda *et al.*, 2001; Reignault *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a inativação do gene *pecC11* não levou a perda completa da atividade de pectato liase, e conseqüentemente, somente diminuiu os sintomas de antracnose, o que é consistente com a presença de outros genes que codificam pectato liase, permitindo ao patógeno uma maior flexibilidade em sua agressividade.

Em relação à análise da expressão diferencial do gene *pecC11* por qPCR em diferentes estágios de infecção no feijoeiro, transcritos de *pecC11* foram observados em todas as fases de desenvolvimento do fungo na planta, mas houve um aumento significativo destes transcritos cinco dias após a infecção, no início da fase necrotrófica do fungo. Nesta fase as hifas secundárias causam degradação extensiva da parede celular vegetal por meio da secreção de vasta gama de despolimerases, dentre estas, a pectato liase (Münch *et al.*, 2008). A expressão de *pel-2* em *C. gloeosporioides* também foi maior no início da fase necrotrófica (Shih *et al.*, 2000). Do mesmo modo, a expressão de *cgmpg2*, gene que codifica endopoligalacturonase, em *C. gloeosporioides* foi detectada em todas as fases de infecção, mas com expressão diferencial maior no início da fase necrotrófica (Li e Goodwin, 2002).

Além de possuir um importante papel no processo de infecção de fungos fitopatogênicos, a enzima pectato liase possui alto potencial biotecnológico nas indústrias, como na produção de sucos de frutas para reduzir viscosidade e aumentar seu rendimento; degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, fermentação de chá e café, aumentar o rendimento e diminuir tempo do processo de extração do petróleo; remoção de matérias com pectina no tratamento de efluentes industriais; e tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas (Lara-Márquez *et al.*, 2011).

Este trabalho foi o primeiro que identificou e caracterizou o gene que codifica pectato liase na fase necrotrófica em *C. lindemuthianum*. A pectato liase codificada pelo gene *pecC11* é importante para agressividade de *C. lindemuthianum*. A análise de pectato liases poderá não somente auxiliar na compreensão da antracnose em feijoeiro comum, mas também poderá levar a descoberta de mais um alvo para o controle dessa doença.

## 2.5 Material e Métodos

### Micro-organismos e condições de cultivo

Nesse trabalho foram utilizados oito isolados pertencentes a diferentes raças fisiológicas do fungo *C. lindemuthianum*: 65451, 72801, 73320, 73497, 75485, 81, 81538 e 89A<sub>2</sub>-3. O isolado A<sub>2</sub>-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* foi utilizado como linhagem selvagem-controle e como linhagem receptora para obtenção de mutantes. As linhagens selvagens, juntamente com as linhagens mutantes foram cultivadas e mantidas em meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) à 22°C.

### Extração de DNA total

Para obtenção de micélio, cerca de 10<sup>6</sup> conídios foram inoculados em meio GPYECH líquido (20 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de extrato de levedura e 1 g de caseína hidrolisada L<sup>-1</sup>) (Ansari *et al.*, 2004) e incubados em câmara de crescimento a 22°C por 5 dias. A extração de DNA total foi realizada segundo o protocolo estabelecido para fungos (Specht *et al.*, 1982) com modificações.

### PCR inverso

O DNA total do isolado 89A<sub>2</sub>-3 de *C. lindemuthianum* foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III, e os fragmentos totais foram ligados com a enzima T4 ligase (Promega®). O produto da reação de ligação foi utilizado como molde para a reação de PCR inverso, utilizando dois oligonucleotídeos específicos iC17d124F e iC17d124R mostrados na Tabela 3. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor *pGEM-T Easy*, utilizando o Kit *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®). A reação de ligação foi utilizada para transformar células ultra competentes de *E. coli* DH5α e o DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas Life Sciences®).

**Tabela 3** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência (5' - 3')	Finalidade
iCl7d124F	AAAGGTCAGCTGCCAAATGT	PCR inverso
iCl7d124R	GCGGTAGAGCTTGCCATAGT	
PLCo11F	GCAACGTTTGCTTCATCTTG	Sonda 1
iCl7d124R	GCGGTAGAGCTTGCCATAGT	
pecCl1FP1	GGTTTGAGGATCCGGAGATT	Split-Marker
pecCl1RP1	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCTGGTTCTTGCCGA TGATG	Sonda 2
pecCl1FP2	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGCACCCCTGGAGTTT GTCTGGT	Split-Marker
pecCl1RP2	TCGTCATCTGCTCAGTCGTC	
NLC37	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA	Split-Marker
NLC38	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Split-Marker
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
pecCl1ForaF	GCAACGTTTGCTTCATCTTG	Controle de inativação
pecCl1Fora R	GGAAGCATTCCAGCAGAAAA	
pCIRTF2	GCAGCTCTGCCTTCCACACT	qPCR
pCIRTR2	CTCGATGACCTTGCTGTTGGT	
ChrRNA3	CCTGTTTCGAGCGTCATTTCA	qPCR
ChrRNA4	CCGGTGCGAGGTGGTATG	

### **Análise *in silico* da sequência do gene *pecCl1***

A sequência completa do gene *pecCl1*, que codifica pectato liase, foi comparada com sequências de outros fungos presentes no banco de dados de proteínas do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997). A partir da sequência de aminoácidos deduzida foi analisada a presença de peptídeo sinal com o programa online SignalP versão 3.0 (Emanuelsson et al., 2007). A sequências completa do gene *pecCl1* foi pesquisada no banco de dados de *C. graminicola* e de *C. higginsianum* (BROAD INSTITUTE, 2009) usando o algoritmo BLASTn para a pesquisa de genes que possuem identidade de sequências.

O alinhamento manual da sequência de aminoácidos da pectato liase de *C. lindemuthianum* e de diversos outros fungos foi realizado pelo programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). As sequências de aminoácidos foram obtidas do banco de dados de proteínas do NCBI (Tabela 4). A árvore de Máxima Parcimônia (MP) foi construída, sendo os testes realizados pelo programa PAUP \* 4.0b10 (Swo Vord, 2002). O método de busca heurística escolhido para construção da árvore foi de bisseção e reconexão de árvores (TBR). Para avaliar a confiabilidade da árvore filogenética, foi aplicado um

bootstrap de 1000. Para visualização da árvore obtida foi utilizado o programa Tree View (Page, 1996).

**Tabela 4** Sequências de aminoácidos de pectato liases obtidas do banco de dados.

<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso</b>
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ27237.1
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ25100.1
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001 pectato liase E	EFQ36566.1
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ25692.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i> pectato liase F	CCF40404.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF47186.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF47031.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF35099.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i> pectato liase E	CCF36739.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF35630.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF42536.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i> pectato liase A	CCF36285.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_749862.1
<i>Nectria haematococca</i> pectato liase C	AAA87382.1
<i>Verticillium albo-atrum</i> pectato liase C	XP_003000624.1
<i>Verticillium dahliae</i> pectato liase C	EGY16103.1
<i>Aspergillus oryzae</i> pectato liase F	XP_001825419.2
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001836194

### **Número de cópias do gene *pecC11***

O DNA total de oito isolados pertencentes a diferentes raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* foi extraído, clivado, e os fragmentos de DNA obtidos foram posteriormente detectados pela técnica de *Southern Blotting* (Sambrook *et al.*, 2001). A hibridização foi realizada com o kit *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche®). A sonda 1 foi marcada em reação de PCR independente com o kit PCR *Dig Probe Synthesis* (Roche®), utilizando os oligonucleotídeos PLCol1F e iC17d124R mostrados na Tabela 3.

### **Inativação do gene *pecC11***

O mutante  $\Delta pecC11$  do isolado A<sub>2</sub>-3 da raça 89 de *C. lindemuthianum* foi obtido por meio da metodologia de *Split-Marker* descrita por Catlett *et al.* (2003). A técnica de *Split-Marker* foi executada a partir de duas rodadas de PCR, utilizando quatro oligonucleotídeos universais para o marcador de seleção de resistência à higromicina (M13R, M13F, NLC37 e NLC38), e quatro oligonucleotídeos específicos para o gene *pecC11* (*pecC11FP1*, *pecC11RP1*, *pecC11FP2* e *pecC11RP2*) mostrados na Tabela 3. Os fragmentos de DNA do cassete de higromicina fosfotransferase (HYG) “HY” e “YG”

foram amplificados a partir do plasmídeo pAN7.1 (Punt *et al.*, 1987) usando os oligonucleotídeos M13R/NLC37 e M13F/NLC38 respectivamente. As reações de PCR foram realizadas com a enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen®).

### **Transformação de *Colletotrichum lindemuthianum***

Para a transformação de *C. lindemuthianum* foi utilizado um procedimento modificado de métodos publicados (Redman e Rodriguez, 1994; Rodriguez e Yoder, 1987). Aproximadamente,  $10^6$  conídios/mL foram inoculados em meio GPYECH à 22 °C por três dias. O micélio foi coletado e lavado, e ressuspensionado em 20 mL de tampão fosfato suplementado com 7 mg/mL de *Lysing Enzyme* (Sigma). A protoplastização foi feita à 30°C sob agitação de 80 rpm durante 4 horas. À 200 µL da suspensão de  $10^7$  protoplastos/mL foi adicionado a solução contendo os cassetes de inativação construídos e 50 µL de solução de polietilenoglicol (PEG 6000 25%, CaCl<sub>2</sub> 50 mM). A mistura foi incubada à 0 °C por 20 minutos, e depois, acrescentou-se mais 500 µL de solução de PEG e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Os protoplastos foram plaqueados em meio BDA contendo sacarose 0,56 M e incubado à 22 °C durante 48 horas. Após a regeneração dos protoplastos, adicionou-se 5 mL de meio BDA semi-sólido contendo 60 µg/mL de higromicina (Sigma-Aldrich). Os transformantes resistentes à higromicina foram posteriormente selecionados e purificados por meio do isolamento monospórico.

### **Seleção dos transformantes com integração específica**

Para selecionar um transformante com integração específica ao locus do gene *pecCl1*, foi realizada uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos, pecCl1ForaF e pecCl1ForaR mostrados na Tabela 3, que amplificam a partir das regiões flanqueadoras do gene *pecCl1*. As amplificações foram realizadas com a Platinum® *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen®).

Para uma caracterização molecular dos transformantes, o DNA total dos transformantes foi extraído, clivado, e os fragmentos de DNA obtidos foram posteriormente detectados pela técnica de *Southern Blotting* (Sambrook et al., 2001). A hibridização foi realizada com o kit *Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche®). A sonda 2 foi marcada em reação de PCR independente com o



kit PCR *Dig Probe Synthesis* (Roche®) seguindo as instruções do fabricante utilizando os oligonucleotídeos específicos pecC11FP1 e pecC11RP1 mostrados na Tabela 3.

### **Teste de patogenicidade**

Para testar a patogenicidade,  $10^6$  conídios das linhagens selvagem e mutante foram inoculados em folhas destacadas de feijoeiro, e mantidas em placas de Petri contendo discos de papel umedecidos em água destilada estéril, sendo então, incubadas por sete dias à 22 °C por um fotoperíodo que compreende 16 horas de luz ( $166 \mu\text{E.s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) e 8 horas de escuro (Dufresne *et al.*, 1998). Ao longo de sete dias consecutivos, as folhas foram observadas e fotografadas a cada 24 horas, com o objetivo de representar todas as etapas do processo de infecção por *C. lindemuthianum*. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, a inoculação foi realizada em triplicata.

### **Ensaio enzimático**

Uma suspensão de aproximadamente  $10^6$  conídios/mL das linhagens selvagem e mutante foi inoculada em meio mineral tamponado suplementado ( $6,98 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ;  $5,44 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ;  $1,0 \text{ g l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $1,1 \text{ g l}^{-1} \text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,6 \text{ g l}^{-1}$  extrato de levedura; e  $3,0 \text{ g l}^{-1}$  pectina) pH 6,8 à 22 °C sob agitação de 120 rpm por três e cinco dias. O micélio foi filtrado e o sobrenadante utilizado para detecção de pectinases extracelulares. A atividade de pectato liase foi determinada espectrofotometricamente a 230 nm por meio da incubação do filtrado de cultura com ácido poligalacturônico 1% (p/v) em tampão Tris/HCl 0,1 M pH 8,5 suplementado com  $\text{CaCl}_2$  1mM resultando na formação de produtos insaturados (Collmer *et al.*, 1988). A reação foi processada à 40 °C por um período de 40 minutos. Uma unidade de atividade de pectato liase é definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de produtos insaturados por litro da cultura por minuto, utilizando-se para cálculo o coeficiente de absorção molar do produto insaturado como sendo de  $5.200 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  (Moran *et al.*, 1968).

### **Análise da expressão gênica**

Ensaio de PCR em tempo real (qPCR) foi realizado para quantificar a expressão do gene *pecC11* em diferentes estágios de infecção no feijoeiro: 3 dias (fase biotrófica), 5 (início da fase necrotrófica) e 7 dias (final da fase necrotrófica). Os conídios foram utilizados para infectar folhas de feijoeiro. Com o auxílio de um pincel, as folhas cotiledonares de feijoeiro foram inoculadas com  $10^6$  conídios (Dufresne *et al.*, 1998).

As folhas foram coletadas com 3, 5 e 7 dias após a inoculação. O micélio e as folhas infectadas foram macerados separadamente e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase RQI RNase-free (Promega®). A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega®). A reação de PCR foi realizada utilizando o kit *SYBER® Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystems®) e as leituras foram realizadas utilizando o equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®). Cada experimento foi conduzido em duplicata biológica, utilizando-se duas amostras de RNAs diferentes. Para a normalização dos níveis de expressão foi utilizado como controle endógeno o gene RNA ribossômico (*rRNA*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkan, N., Fluhr R., Sherman, A., Prusky, D.** (2008) Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1058-1066.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.
- Annis, S.L. and Goodwin, P.H.** (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 1-14.
- Ansari, K.I., Palacios, N., Araya, C., Langin, T., Egan, D., Doohan, F.M.** (2004) Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology*, **53**, 635-642.
- Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A., Penttilä, M.** (2002) ACEI is a repressor of cellulase and xylanase genes in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 56-65.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M.** (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 719-739.
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J.** (1992) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, 388.
- Barcelos, Q.L., Souza, E.A., Damasceno e Silva K.J.** (2011) Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. *Genetics and Molecular Research*, **10**, 1, 230-242.
- Barthe, J.P., Cantenys, D., Touzé, A.** (1981) Purification and characterization of two polygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology*, **100**, 162-171.
- Basse, C.W., Farfsing, J.W.** (2006) Promoters and their regulation in *Ustilago maydis* and other phytopathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **254**, 208-216.
- Ben-Daniel, B., Bar-Zvi, D., Tsrer (Lahkim), L.m.**(2011) Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. *Molecular Plant Pathology*, **10**, 1364-3703.
- Catlett, N.L., Lee, B.N., Yoder, O.C., Turgeon, B.G.** (2003) Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics News*, **50**, 9-11.
- Centis, S., Dumas, B., Fournier, J., Marolda, M., Esquerré-Tugayé, M.T.** (1996) Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an

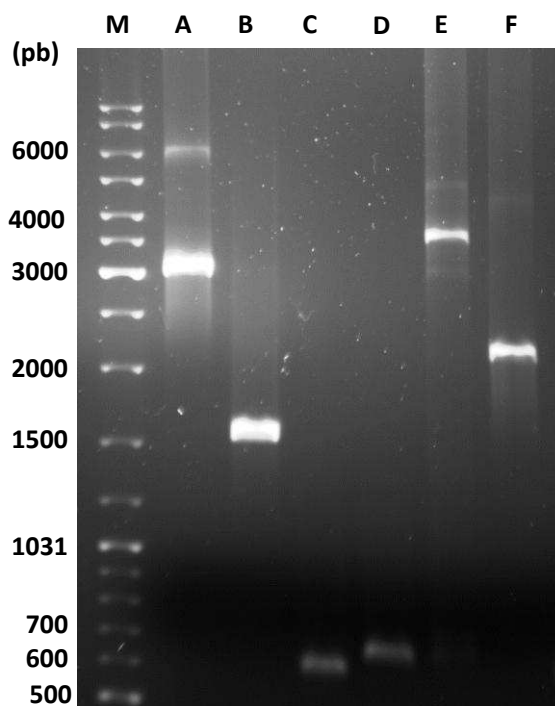
- endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Gene*, **170**, 125-129.
- Centis, S., Guillas, I., Sejalon, N., Esquerré-Tugayé, M.T., Dumas, B.** (1997) Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, **10**, 769-775.
- Collmer, A., Ried, J.L., Mount, M.S.** (1988) Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*, **161**, 329-399.
- Colot, H., Park, G., Jones, J., Turner, G., Borkovich, K., Dunlap, J.C.** (2006) High throughput knockout of transcription factors in *Neurospora* reveals diverse phenotypes. *PNAS*, **103**, 10352-10357.
- Damasceno e Silva, K.J., Souza, E.A., Ishikawa, F.H.** (2007) Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Phytopathology*, **155**, 241-247.
- Dufresne, M., Bailey, J.A., Michel, D., Langin, T.** (1998) *clk1*, a serine/threonine protein kinase encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 99-108.
- Emanuelsson, E., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H.** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols*, **2**, 953-971.
- Fontenelle, M.R.** Detecção e análise de genes que são expressos na interação *Colletotrichum lindemuthianum*-*Phaseolus vulgaris* (2010) Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 92.
- Geffroy, V., Sicard, D., De Oliveira, J.C., Seignac, M., Cohen, S., Gepts, P.; Neema, C., Langin, T., Dron, M.** (1999) Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 774-784.
- Geffroy, V., Seignac, M., De Oliveira, J.C., Fouilloux, G., Skroch, P., Thoquet, P., Gepts, P., Langin, T. and Dron, M.** (2000) Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 287-296.
- Gravelat, F.N., Askew, D.S., Sheppard, D.C.** (2012) Targeted gene deletion in *Aspergillus fumigatus* using the hygromycin-resistance split-marker approach. *Methods in Molecular Biology*, **845**, 119-30.
- Herbert, C., O’Connell, R., Gaulin, E., Salesses, V., Esquerre-Tugaye, M.T., Dumas, B.** (2004) Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 140-147.

- Jia, J. and Wheals, A.** (2000) Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*, **38**, 264-70.
- Kramer-Haimovich, H., Servi, E., Katan, T., Rollins, J., Okon, Y. and Prusky, D.** (2006) Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1034-1039.
- Krijger, J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H.B., Wirsal, S.G.R.** (2008) The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 10, 1325-1336.
- Lara-Márquez, A., Zavala-Páramo, M.G., López-Romero, E., Camacho, H.C.** (2011) Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters*, **33**, 859-868.
- Lebeda, A., Luhová, L., Sedlářová, M., Jancova, D.** (2001) The role of enzymes in plant-fungal pathogen interactions. *Journal of Plant Disease and Protection*, **108**, 89-111.
- Li, J. and Goodwin, P.H.** (2002) Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*. *Journal of Phytopathology*, **150**, 213-219.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method," *Methods*, **25**, 402-408.
- Miyara, I., Shafran, H., Kramer-Haimovich, H., Rollins, J., Sherman, A., Prusky, D.** (2008) Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 281-291.
- Moran, F., Nasuno, S., Starr, M.P.** (1968) Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **123**, 298-306.
- Münch, S., Ligner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N., Deising, H.B.** (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 41-51.
- Münch, S., Ludwig, N., Floss, D.S., Sugui, J.A., Koszucka, A.M., Voll, L.M., Sonnewald, U., Deising, A.H.B.** (2011) Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Molecular Plant Pathology*, **12**, 1, 43-55.
- Page, R.D.M.** (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in Biosciences*, **12**, 357-358.

- Pellier, A.L., Laugé, R., Veneault-Fourrey, C., Langin, T.** (2003) CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology*, **48**, 639-655.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J., Green, J.R.** (1999) *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal-Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 186-198.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., Van Den Hondel, C.A.M.J.J.** (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, **56**, 117-124.
- Sicard, D.; Michalakis, Y.; Dron, M.; Neema, C.** (1997) Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of origin of its wild host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, **87**, 807-13.
- Shih, J., Wei, Y., Goodwin, P.H.** (2000) A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, **243**, 139-150.
- Swo Vord, D.L.** (2002) Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
- Redman, R.S. and Rodriguez, R.J.** (1994) Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology*, **18**, 230-246.
- Reignault, Ph., Valette-Collet, O., Boccara, M.** (2008) The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology*, **120**, 1-11.
- Rodriguez, R.J. and Yoder, O.C.** (1987) Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene*, **54**, 73-81.
- Rogers, L.M., Kim, Y.K., Guo, W., González-Candelas, L., Li, D., Kolattukudy, P.E.** (2000) Requirement for either a host or pectin induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *PNAS*, **97**, 9813-9818.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C.** (1982) A method for extracting high molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, **119**, 158-163.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.** (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.

- Wijesundera, R.L.C., Bailey, J.A., Byrde, R.J.W.** (1984) Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *Journal of General Microbiology*, **130**, 285-290.
- Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, N.T., Dinoor, A., Pines, O., Prusky, D.** (2001) *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit– fungus interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **14**, 988-995.
- You, B.J., Lee, M.H., Chung, K.R.** (2009) Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. *Archives of Microbiology*, **191**, 615-622.

## ANEXO



**Fig. S1.** Confirmação dos fragmentos de DNA obtidos por PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. A e B – Fragmentos amplificados a partir do gene de resistência a higromicina presente no plasmídeo pAN7.1. C e D – Fragmentos amplificados a partir da região flanqueadora do gene *pecCII* de *C. lindemuthianum*. E e F - Fragmentos finais da técnica de *Split-Marker*, E - tem como molde os fragmentos presentes em A e C, enquanto F - tem como molde os fragmentos presentes em B e D. O marcador de tamanho (M) usado foi o O'GeneRuler™ Ladder Mix.