

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELVIO HENRIQUE BENATTO PERINO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS
UREASE E ALLANTOICASE EM *Colletotrichum graminicola* UTILIZANDO
MUTANTES *URE1:EGFP* E *ALA1:EGFP***

CURITIBA
2017

ELVIO HENRIQUE BENATTO PERINO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS
UREASE E ALLANTOICASE EM *Colletotrichum graminicola* UTILIZANDO
MUTANTES *URE1:EGFP* E *ALA1:EGFP***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke

Co-orientador: Prof. Dr. Holger Bruno Deising

CURITIBA
2017

P445a Perino, Elvio Henrique Benatto

Análise da expressão e localização subcelular das proteínas uréase e *allantoicase* em *colletotrichum graminicola* utilizando mutantes URE1: EGFP e ALA1: EGFP / Elvio Henrique Benatto Perino. – Curitiba, 2017. 104f. : il. [algumas color.]; tabs. : color. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, no curso de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke

Co-orientador: Prof. Dr. Holger Bruno Deising

1. Alimentos geneticamente modificados. I. Glienke, Chirlei. II. Deising, Holger Bruno. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 641.303



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de ELVIO HENRIQUE BENATTO PERINO, intitulada: "Análise da expressão e localização subcelular das proteínas urease e allantoicase de *Colletotrichum graminicola* utilizando mutantes *URE1:EGFP* e *ALAI:EGFP*", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 30 de maio de 2017


Doutor Wagner Vicente Pereira
Membro Titular


Doutora Ana Claudia Bonatto
Membro Titular


Doutora Chirlei Glienke
Presidente

“E se a nossa luta é pra valer,
Vou mostrar meu valor”
- Hironobu Kageyama

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus. Que está sempre presente na minha vida, me guiando e confortando nas horas difíceis e abençoando com cada conquista alcançada. À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e aos professores do Departamento de Genética pelas oportunidades e contribuições em minha formação acadêmica. Aos meus pais, Tânia e Elvio, meus irmãos, Daniella e Fernando, e meu cunhado Rafael por todo o apoio, amor e confiança que recebi e recebo. Vocês são a melhor família que alguém poderia ter. À minha grande e unida família.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Profa. Dra. Chirlei Glienke, pela oportunidade que me deu em crescer como profissional e como pessoa, pelos ensinamentos transmitidos e amizade. Ao co-orientador Prof. Dr. Holger Bruno Deising. Aos membros da banca de acompanhamento, Profa Dra Ana Cláudia Bonatto e Profa Dra Lygia Vitória Galli Terasawa, e à Profa. Dra. Vanessa Kava por todo auxílio e contribuições para o nosso trabalho. Ao Dr. Wagner Vicente Pereira pelas futuras contribuições.

Um “Obrigado de nada” aos meus colegas de laboratório, Desirrê, Fran, Sandrielle, Miriam, Paloma e Renata pelas risadas, áudios e fotografias mais engraçadas e de momentos muito especiais. Em especial, pela convivência profissional e pessoal, à Lisandra Ferreira Maba que se dispôs a me ajudar com prazos tão limitados e que conseguiu contribuir imensamente para este trabalho, em tão pouco tempo. Alan Silva e Daiani Savi que contribuíram exageradamente muito para este trabalho mesmo à distância. Obrigado pelos ouvidos e pelo apoio. Ao técnico do LabGeM, Rodrigo Aluizio, por toda a ajuda no laboratório.

Aos meus amigos, que não permitiram que a insanidade tomasse conta de mim nos momentos mais apurados, e que comemoraram comigo quando a luz no fim do túnel foi vista. Aos amigos Raphael e Rebeca, ninguém entende tão bem quanto eles os momentos de alegria e desespero que se intercalam com uma velocidade impressionante. Aos amigos que são quase minha família Tai, Michel, Micheli, Mari, Darlan, Paulo José, Ale, Kamide, André, David, Douglas, Paulo Vitor. E

aos amigos de longa data Bia, Diego, Marcos, Gabi, Coala, Didi, Mara, Elaine e Fre que mesmo distantes sempre me apoiaram.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Valter Antônio Baura pelo auxílio técnico na parte do sequenciamento. À CAPES e Fundação Araucária, por todo o apoio financeiro, principalmente ao LabGeM.

A todos que de alguma maneira cederam uma parcela de carinho, esforço, incentivo para a realização desse trabalho.

RESUMO

O Brasil destaca-se por ser o terceiro maior produtor mundial de milho, entretanto, apesar desta alta produtividade, esta cultura é afetada por um grande número de doenças. Estas doenças acarretam em perdas na produção, sendo a antracnose uma das doenças fúngicas com maior relevância, de distribuição mundial. O fungo responsável pela antracnose é o *Colletotrichum graminicola*. Em estudos funcionais de genes associados a virulência e patogenicidade nesta espécie, foi demonstrado que o processo de penetração na planta é atenuado em transformantes com mutação ou deleção dos genes allantoicase e/ou urease (MÜNCH et al, 2011, GLIENKE et al, 2015). Com base nesses trabalhos sugere-se que as enzimas allantoicase e urease são importantes para os estágios iniciais do processo de infecção no hospedeiro por *C. graminicola*. A fim de determinar em que estágio do desenvolvimento do fungo e onde essas enzimas celulares atuam neste fitopatógeno, foram obtidos e analisados mutantes de *C. graminicola* para os genes urease e allantoicase (*ALA1:eGFP* e *URE1:eGFP*), os quais apresentam fusão dos genes alvo com o gene repórter *eGFP*. Os mutantes foram caracterizados, sendo selecionados somente aqueles que apresentavam cópia única do cassete inserido no local correto e fluorescência em microscopia. Todos os mutantes apresentando essas características, assim como três ectópicos referentes a cada transformação foram avaliados quanto aos sintomas produzidos em folhas de milho destacadas, localização subcelular através do gene repórter, quanto ao crescimento em meio de cultura com restrição de nitrogênio, bem como a atividade das enzimas urease e allantoicase. Com base nos resultados de microscopia de fluorescência, sugere-se que as enzimas urease e allantoicase estão presentes principalmente no citoplasma de esporos de *C. graminicola* antes da germinação e formação de apressório, sendo que a fluorescência é fortemente reduzida nos estágios iniciais do processo de infecção, ou seja, em tubos germinativos, em hifas de penetração e biotróficas. Nenhuma fluorescência foi observada em hifas necrotróficas do fungo.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Colletotrichum graminicola*, *eGFP*, urease, allantoicase.

ABSTRACT

Brazil is the third largest producer of maize in the world, however despite this productivity, the culture is affected by a large number of diseases, which lead to losses in production. Anthracnose is one of the main fungal diseases and has a worldwide distribution. The fungus responsible for the anthracnose disease is *Colletotrichum graminicola*. In functional studies of genes associated with virulence and pathogenicity processes in this specie, it has been shown that the plant penetration process is attenuated in transformants with mutation or deletion of allantoicase and/or urease genes (GLIENKE et al, 2015; MÜNCH et al, 2011). Based on these studies, it is suggested that the enzymes allantoicase and urease are important to the initial penetration stages for *C. graminicola*. To determine the development stage and the cellular location these enzymes act in this pathogen, the objective was to obtain and analyze *C. graminicola* mutants (*ALA1:eGFP* and *URE1:eGFP*) with fusion of the target genes, allantoicase and urease, with the reporter gene *eGFP*. The mutants were characterized and only those which presented a single copy of the construct in the right position and fluorescence in microscopy were selected. All the selected mutants and three ectopics for each gene were evaluated by produced symptoms in detached maize leaves, cellular localization through the reporter gene, ability to grow in nitrogen limitation medium, as well as the enzymes activity for urease and allantoicase gene. Based on the results, we conclude that the enzymes urease and allantoicase are present mainly in the cytoplasm of the *C. graminicola* conidia before germination and appressoria formation, the fluorescence is severely reduced in the initial stage of infection, i.e. in germ tube and biotrophic and penetration hyphae. No fluorescence was observed in necrotrophic hyphae of *C. graminicola*.

Keywordse: *Zea mays*, *Colletotrichum graminicola*, *eGFP*, urease, allantoicase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção e área cultivada de milho no Brasil de 1997 a 2013.	19
Figura 2 – Sintomas da antracnose foliar do milho.	20
Figura 3 - Modelo de estruturas de infecção de <i>C. graminicola</i>	22
Figura 4 - Participação das enzimas allantoiase e urease na degradação de ácido úrico.	24
Figura 5 – Taxas de germinação de conídios e de penetração da linhagem selvagem e dos mutantes <i>AT171</i> , <i>ΔALA12</i> , <i>ΔALA29</i> , <i>ΔURE59</i> e <i>ΔURE24</i> de <i>Colletotrichum graminicola</i>	26
Figura 6 – Cassete de fusão e estratégia de recombinação homóloga para fusão do <i>eGFP</i> +gene de resistência com as proteínas alvo.	35
Figura 7 – Mapa dos vetores utilizados para construção dos cassetes de transformação. a) <i>pGFPG418</i> (o autor); b) Mapa do vetor de transformação <i>pSH1.6EGFP</i> (modificado de OLIVEIRA-GARCIA, 2013).	36
Figura 8 - Localização dos <i>primers</i> utilizados para a seleção dos mutantes por PCR.	41
Figura 9 – Exemplo de localização dos <i>primers</i> utilizados para PCR de seleção em linhagens de <i>C. graminicola</i> fusionadas e ectópicas ou selvagem.	42
Figura 10 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR das região codificante 5', região 3'-flanqueada, do <i>GFP+G418</i> (gene que confere resistência à geneticina) e do gene que confere resistência à higromicina utilizados para a construção dos cassetes <i>URE1:eGFP</i> e <i>ALA1:eGFP</i>	49
Figura 11 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com os <i>primers nested</i> da produto de fusão do cassete <i>ALA1:eGFP+Hygro</i> (~3,8 kb) e do plasmídio extraído após clonagem em <i>E. coli</i> do cassete <i>URE1::eGFP+G418</i> (~4,6 kb).	50
Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com <i>primers</i> <i>CgUProbeNF (Out)</i> e <i>CgGentaProbeR2 (In)</i> (A) e <i>CgUProbeNF (Out)</i> e <i>CgramUreFR (Out)</i> (B) dos 5 mutantes fusionados (<i>URE1:eGFP</i>), 3 mutantes ectópicos (<i>URE1e</i>) e a linhagem selvagem (WT) de <i>C. graminicola</i>	51
Figura 13 – Análise de <i>Southern Blot</i> para os mutantes <i>URE1:eGFP</i> A) Localização dos cortes das enzimas de restrição e sonda utilizadas nas análises	

por <i>Southern Blot</i> . B e D) Análise de <i>Southern Blot</i> do DNA dos mutantes <i>URE1:eGFP</i> e linhagem <i>C. graminicola</i> M01, digeridas com <i>XhoI</i> . C) Análise de <i>Southern Blot</i> do DNA dos mutantes <i>URE1:eGFP</i> e linhagem de <i>C. graminicola</i> M01, digeridas com <i>HindIII</i>	53
Figura 14 - Fotomicrografias em campo claro (luz) e de epifluorescência de 5 mutantes <i>URE1:eGFP</i> (4, 21, 50 e 67), da linhagem selvagem (WT), mutante ectópico <i>URE1e2</i> e um mutante com expressão constitutiva do GFP (<i>TGFP</i>), 24 horas após inóculo de esporos de <i>C. graminicola</i> em epiderme do catáfilo de cebola. Continua na próxima página.	54
Figura 15 - Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com primers <i>CgramAllaSbF (Out)</i> e <i>HygProbeR (In)</i> (A) e <i>AllaGFPNestedForw (Out)</i> e <i>Alla3Cgram.R1 (Out)</i> (B) do mutante <i>ALA1:eGFP8</i> , dos mutantes ectópicos <i>ALA1e13</i> , <i>ALA1e15</i> e <i>ALA1e16</i> e a linhagem selvagem (WT) de <i>Colletotrichum graminicola</i> M01.	56
Figura 16 – A) Localização dos cortes das enzimas de restrição <i>BamHI</i> , <i>BglII</i> e <i>PstI</i> e sonda utilizadas na análise por <i>Southern Blot</i> . Análise de <i>Southern Blot</i> do DNA do mutante <i>ALA1:eGFP8</i> , linhagem selvagem de <i>C. graminicola</i> M01, e ectópicos digeridas com <i>BamHI</i> (B), <i>BglII</i> (C) e <i>PstI</i> (D).....	58
Figura 17 – Fotomicrografias de campo claro (luz) e de epifluorescência dos mutantes <i>ALA1:eGFP8</i> e <i>ALA1e13</i> e da linhagem selvagem de <i>Colletotrichum graminicola</i> M01(WT) e do mutante <i>TGFP</i> que apresenta expressão constitutiva do gene <i>GFP</i> 24 horas após inóculo de esporos em epiderme de catáfilo de cebola.....	59
Figura 18 - Microscopia de luz (a, c, e) e de epifluorescência (b, d, f) de esporos dos mutantes <i>URE1:eGFP67</i> (a, b), <i>URE1:eGFP21</i> (c, d) e <i>URE1:eGFP4</i> (e, f) de <i>C. graminicola</i> , 24 horas após inoculação em folhas de milho, apresentando fluorescência em esporos não germinados no citoplasma de forma pontilhada fina e grossa.....	61
Figura 19 - Microscopia de epifluorescência (b, d e f) e de campo claro (a, c e e) de esporos e hifas do mutante <i>ALA1:eGFP8</i> de <i>C. graminicola</i> , 24 horas (e e f) e 72 horas (a, b, c e d) após inoculação em folha de milho, apresentando fluorescência em esporos não germinados no citoplasma de forma pontilhada fina e grossa.....	62

Figura 20 – Fotomicrografias da linhagem selvagem (WT), dos mutantes <i>URE1:eGFP</i> 4, 21, 50 e 67, um mutante ectópico <i>URE1e2</i> e um mutante com expressão constitutiva do <i>GFP</i> (<i>TGFP</i>), 24 horas e 48 horas após o inóculo de esporos de <i>C. graminicola</i> em folhas de milho.....	63
Figura 21 – Fotomicrografias do mutante <i>ALA1:eGFP8</i> , linhagem selvagem (WT). Mutante ectópico <i>ALA1:e13</i> e um mutante com expressão constitutiva do <i>eGFP</i> (<i>TGFP</i>), 24 horas e 48 após o inóculo de esporos de <i>C. graminicola</i> em folhas de milho.	65
Figura 22 – Fotomicrografias compostas de campo claro DIC e epifluorescência FITC dos mutantes <i>URE1:eGFP4</i> , <i>ALA1:eGFP8</i> , <i>TGFP</i> e da linhagem selvagem de <i>C. graminicola</i> M01 de esporos, esporos germinados, hifas superficiais, hifas biotróficas e hifas necrotróficas.....	67
Figura 23 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT), mutante fusionado (<i>ALA1:eGFP8</i>), ectópicos (<i>ALA1e13</i> , <i>ALA1e15</i> e <i>ALA1e16</i>) deletados (Δ <i>ALA12</i> e Δ <i>ALA29</i>) e o atenuado <i>AT171</i> para o gene allantoicase de <i>Colletotrichum graminicola</i>	69
Figura 24 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT), mutantes fusionados (<i>URE1:eGFP4</i> , <i>URE1:eGFP21</i> , <i>URE1:eGFP50</i> e <i>URE1:eGFP67</i>), ectópicos (<i>URE1e2</i> , <i>URE1e3</i> e <i>URE1e9</i>) e deletados (Δ <i>URE24</i> e Δ <i>URE59</i>) para o gene urease de <i>Colletotrichum graminicola</i>	70
Figura 25 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT) e os mutantes fusionados <i>URE1:eGFP4</i> e <i>URE1:eGFP50</i> para o gene urease de <i>Colletotrichum graminicola</i> , com e sem adição de sulfato de amônio (10mM).	71
Figura 26 – Teste de atividade das enzimas urease e allantoicase via alteração de pH. (A) Crescimento micelial da linhagem selvagem (WT), mutantes fusionados (<i>URE1:eGFP4</i> , <i>URE1:eGFP21</i> , <i>URE1:eGFP50</i> e <i>URE1:eGFP67</i>), ectópicos (<i>URE1e2</i> <i>URE1e3</i> e <i>URE1e9</i>) e deletados (Δ <i>URE24</i> e Δ <i>URE59</i>) para o gene urease de <i>Colletotrichum graminicola</i> , 05 dias após inoculação em meio ureia com Azul de Bromotimol. (B) Crescimento micelial da linhagem selvagem (WT), mutante fusionado (<i>ALA1:eGFP8</i>), ectópicos (<i>ALA1e13</i> , <i>ALA1e15</i> e <i>ALA1e16</i>) deletados (Δ <i>ALA12</i> e Δ <i>ALA29</i>) e o atenuado <i>AT171</i> para o gene	

allantoicase de <i>Colletotrichum graminicola</i> , 05 dias após inoculação em meio alantoína com Azul de Bromotimol.....	73
Figura 27 – Crescimento micelial (verso e reverso da colônia) da linhagem selvagem (WT), e dos mutantes <i>ALA1:eGFP8</i> (fusionado), Δ <i>ALA12</i> (deletado) e <i>AT171</i> (atenuado) em meio de cultura YNB suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio).	75
Figura 28 – Crescimento micelial (verso e reverso da colônia) da linhagem selvagem (WT), e dos mutantes <i>URE1:eGFP21</i> (fusionado) e Δ <i>URE1</i> (deletado) em meio de cultura YNB suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio). Avaliação de crescimento das linhagens selvagem, em meios com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio).	76
Figura 29 – Esquema das sequências obtidas e localização de inserção do cassete de fusão <i>URE:eGFP</i> ocorrida por recombinação homóloga em mutantes <i>URE1:eGFP</i>	77
Figura 30 – Estrutura das proteínas urease e GFP. a) Estrutura da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (Swiss Model: 4gy7.1.A); b) Estrutura da proteína eGFP caracterizado por Barondeau e colaboradores (2007).....	78
Figura 31 – Região do alinhamento para o sítio ativo (s), sítio de fosforilação de Tirosina-quinase e região C-terminal da sequência de aminoácidos de ureases de diferentes organismos.	80
Figura 32 - Estrutura da urease de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
Figura 33 – Região do alinhamento da sequência de aminoácidos de allantoicases de diferentes organismos para o sítio de amidação.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições utilizadas para PCR da segunda etapa de DJ-PCR.	37
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados no presente trabalho.	38
Tabela 3 – Códigos de acesso das sequências de aminoácidos utilizados para análises <i>in silico</i> no banco de dados UNIPROT.	48
Tabela 4 – Comparação entre proteínas ureases produzidas por <i>C. graminicola</i> e <i>C. ensiformis</i>	79
Tabela 5 - Comparação de similaridade entre as proteínas ureases de diferentes microrganismos com <i>C. graminicola</i>	81
Tabela 6 - Comparação das enzimas allantoicases de <i>C. graminicola</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
Tabela 7 – Comparação da allantoicase de diferentes microrganismos com <i>C. graminicola</i>	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	<i>Colletotrichum graminicola</i> E ANTRACNOSE NO MILHO	19
3.2	UTILIZAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO, ENZIMAS UREASE E ALLANTOICASE	22
3.3	ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	34
4.2	CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE FUSÃO PARA AS PROTEÍNAS ALLANTOICASE E UREASE COM A PROTEÍNA FLUORESCENTE <i>eGFP</i>	34
4.3	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Colletotrichum graminicola</i>	39
4.4	SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES	40
4.4.1	Seleção por PCR	40
4.4.2	Determinação por <i>Southern Blot</i> do número de cópias dos cassetes inseridos nos mutantes	42
4.4.3	Análise dos mutantes em microscopia de fluorescência	43
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM A PROTEÍNA <i>eGFP</i> EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	44
4.6	ANÁLISE DE SINTOMAS EM FOLHAS DE MILHO	45
4.7	ANÁLISE FUNCIONAL DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM O GENE <i>eGFP</i>	46
4.7.1	Utilização de fontes de nitrogênio	46
4.7.3	Análise <i>in silico</i> das enzimas da via de degradação do ácido úrico	47
5	RESULTADOS	49
5.1	CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE FUSÃO <i>URE1:eGFP</i> E <i>ALLA1:eGFP</i>	49
5.2.1	Seleção por PCR	51

5.2.2	Determinação do número de cópias dos genes nos mutantes por <i>Southern Blot</i>	52
5.2.3	Análise por microscopia de fluorescência.....	53
5.3	OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS MUTANTES <i>ALA1:eGFP</i>	56
5.3.1	Seleção por PCR	56
5.3.2	Determinação por <i>Southern Blot</i> do número de cópias do cassete inseridos nos mutantes	57
5.3.3	Análise por microscopia de fluorescência	58
5.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS UREASE E ALLANTOICASE FUSIONADAS COM A PROTEÍNA <i>eGFP</i>	60
5.5	INDUÇÃO DE SINTOMAS EM FOLHAS DE MILHO DESTACADAS	68
5.6	ANÁLISE FUNCIONAL DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM O GENE <i>eGFP</i>	72
5.6.1	Utilização de fontes de nitrogênio	72
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	101
	Anexo A – Lista de meios de cultura	102
	Anexo B – Lista de soluções	104

1 INTRODUÇÃO

O Brasil obtém o terceiro lugar na produção mundial de milho, atrás apenas dos Estados Unidos e da China (CONAB, 2013). Foi responsável, na safra de 2014/2015, pela produção de 80 milhões de toneladas de milho (FAO, 2016). Com a evolução do sistema de cultivo, disponibilidade de genótipos mais produtivos e adaptados às diferentes regiões, mecanização, aumento da área de plantio, inclusive da segunda safra, a produção de milho no Brasil tem aumentado significativamente (PARREIRA et al, 2016).

Entretanto, apesar da expressiva produção de milho pelo Brasil, a cultura ainda é muito afetada, principalmente por doenças, como a antracnose foliar do milho, causada por *Colletotrichum graminicola* com distribuição mundial (SANZ-MARTIN et al, 2016). A antracnose foi reconhecida como um dos principais problemas da cultura do milho em áreas que adotam o sistema de plantio direto, ou ainda que não realizam a rotação de cultura (cultivo safrinha) (COÊLHO et al, 2001; COSTA et al, 2014). A doença está presente em regiões de clima temperado e tropical, com temperaturas elevadas no verão, podendo se tornar fator limitante para o desenvolvimento da cultura (PINTO, 2003; COTA et al, 2012). Lesões foliares apresentam-se como fonte de inóculo para as infecções secundárias e, devido à colonização vascular do colmo, provoca redução no enchimento dos grãos, causando o tombamento (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; CASELA et al, 2008) e conseqüentemente redução na produtividade de 18% (CARSON; HOOKER, 1981) a 50% (PINTO, 2003).

Com relação aos mecanismos de patogenicidade, *C. graminicola* tem um comportamento hemibiotrófico no hospedeiro (KRIJGER et al, 2008), ou seja, uma curta fase biotrófica, durante a qual as células do hospedeiro continuam vivas, seguida por um desenvolvimento agressivo, denominado de fase necrotrófica, caracterizada por matar as células do hospedeiro. Tendo em vista essa característica, Münch e colaboradores (2011) obtiveram uma coleção de mutantes aleatórios (via agrotransformação), e alguns apresentaram taxas reduzidas de penetração em folhas de milho. Na caracterização do local de inserção do T-DNA em um destes mutantes (AT171), os autores observaram que a integração ocorreu na região promotora de um gene com alta homologia ao da allantoicase de outros

ascomicotas, como *Neurospora crassa* e *Magnaporthe oryzae*. O transformante AT171 apresentou um retardo no crescimento em diversas fontes de carbono, quando comparado com a linhagem selvagem. Assim, de acordo com Münch e colaboradores (2011), esse gene é necessário tanto para o crescimento de forma geral quanto para a virulência completa do fungo, pois está envolvido nos estágios iniciais de infecção de *C. graminicola*.

Alterações nos processos de infecção em fungos por limitação de nitrogênio já são bem estabelecidas (TALBOT et al, 1997). Uma vez que as fontes de nitrogênio assimiláveis são limitadas no ambiente, as enzimas urease e allantoicase passam a ter papéis importantes para a obtenção de amônio, influenciando assim no crescimento e virulência de microrganismos (RUTHERFORD, 2014; XU et al, 2016). A bactéria *Helicobacter pylori*, por exemplo, utiliza a enzima urease para aclimatação ácida, possibilitando seu desenvolvimento no estômago de humanos (MOLLENHAUER-REKTORSCHKE et al, 2002). Essa enzima é também necessária para a virulência de *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides posadasii*, fungos que causam doenças pulmonares em humanos (COX et al, 2000).

Apesar de vários estudos demonstrarem a necessidade da produção das enzimas allantoicase e urease para a patogenicidade e virulência, pouco se sabe sobre o papel dessas enzimas durante o processo de infecção (MÜNCH et al, 2011; RUTHERFORD, 2014). Estudos prévios (GLIENKE et al, 2015) utilizando mutantes com deleção dos genes allantoicase e mutantes com deleção do gene urease em *C. graminicola*, demonstraram uma taxa reduzida de penetração em folhas de milho e retardo no desenvolvimento de lesões. Com base nesses estudos, o presente trabalho teve por objetivo investigar em que estágio do desenvolvimento do fitopatógeno *C. graminicola* as enzimas allantoicase e urease são sintetizadas, bem como demonstrar a localização subcelular das mesmas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivo identificar a fase de infecção em que as enzimas urease e allantoicase são sintetizadas em *Colletotrichum graminicola*, bem como localizar celularmente estas enzimas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

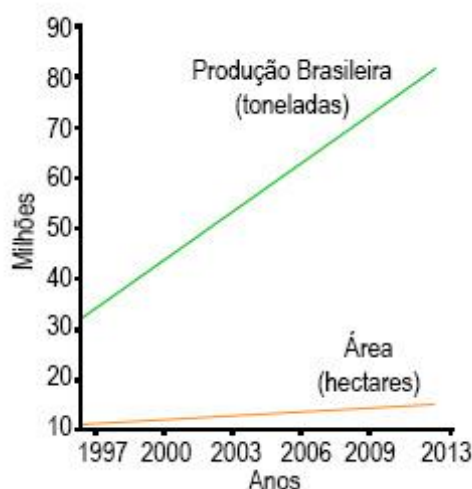
- Construir os vetores de fusão *URE1:eGFP* e *ALA1:eGFP* utilizando DJ-PCR;
- Obter transformantes de *Colletotrichum graminicola* expressando a proteína *eGFP* fusionada na extremidade 3' das proteínas urease e allantoicase;
- Inocular os transformantes em folhas de milho e analisar a síntese das proteínas urease e allantoicase após 4, 24, 48 e 72 horas em microscopia de fluorescência;
- Avaliar atividade das proteínas *URE1:eGFP* e *ALA1:eGFP* em meios com restrição de nitrogênio e em folhas de milho.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Colletotrichum graminicola* E ANTRACNOSE NO MILHO

Cultivado em diferentes sistemas produtivos, o milho é plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. O grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (MAPA, 2015). A produtividade do milho tem aumentado com o decorrer dos anos com médias acima de 14 t/ha (Figura 1). Existem duas safras anuais de milho no Brasil: a de verão (primeira safra) e a safrinha (segunda safra). Desta forma, o milho acaba também interferindo no desenvolvimento de outras culturas, como a soja, que, em função destas mudanças, obtiveram-se índices baixos de produtividade (CONAB, 2014).

Figura 1 – Produção e área cultivada de milho no Brasil de 1997 a 2013.



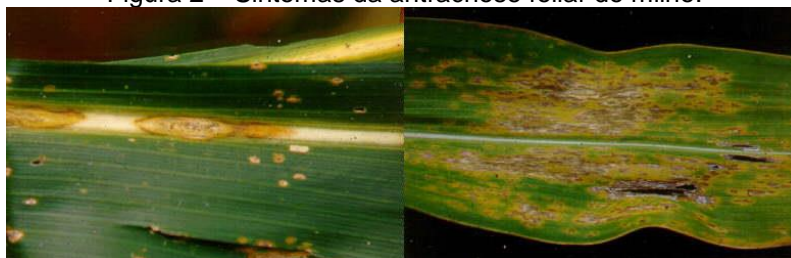
Fonte: adaptado de CONAB, 2014.

Devido à sua importância agrônômica, o milho tem se tornado um modelo clássico para estudos (SANZ-MARTIN et al, 2016). Dentre os fatores que contribuem para a perda na produção do milho no Brasil, as doenças são consideradas como um dos mais importantes. Dentre elas, as podridões de colmo destacam-se entre as mais severas doenças e vêm causando grande preocupação devido aos danos causados à cultura. Diversas espécies fitopatogênicas estão inseridas no gênero

Colletotrichum e praticamente todas causam antracnoses e podridões (WEIHMANN et al, 2016). Membros deste gênero causam perdas severas em culturas economicamente importantes, dentre elas frutíferas, leguminosas e plantas ornamentais (DEAN et al, 2012). Entretanto, somente a espécie *C. graminicola* pode causar perdas superiores a 1 bilhão de dólares por ano (WEIHMANN et al, 2016). No Brasil e em outras partes do mundo, podridões em milho causadas por *C. graminicola* são comumente conhecidas como antracnose do colmo ou antracnose foliar, caracterizada pela presença de lesões de coloração marrom escura e de formas variadas, normalmente elípticas, nas nervuras foliares, sendo às vezes difícil o seu diagnóstico. Sob condições favoráveis, as lesões podem coalescer, necrosando grande parte do limbo foliar (

Figura 2). No interior das lesões surgem pontuações escuras que correspondem às estruturas de frutificação do patógeno, denominadas acérvulos – principal característica que diferencia a antracnose de outras podridões causadas por diferentes microrganismos (FANTIN; DUARTE, 2009).

Figura 2 – Sintomas da antracnose foliar do milho.



Fonte: Embrapa – Cultivo do Milho, 2007.

Esse tipo de doença pode ocorrer antes da fase de enchimento dos grãos, reduzindo a absorção de água e nutrientes e a translocação destes para a espiga, causando tombamento ou morte prematura das plantas, ou após a maturação fisiológica dos grãos, dificultando a colheita mecânica e causando a exposição das espigas à ação de roedores e ao apodrecimento (CASELA et al, 2008; COSTA et al, 2008). As podridões de colmo iniciam-se, em geral, pelas raízes, progredindo para os entrenós superiores (FERNANDES et al, 2005).

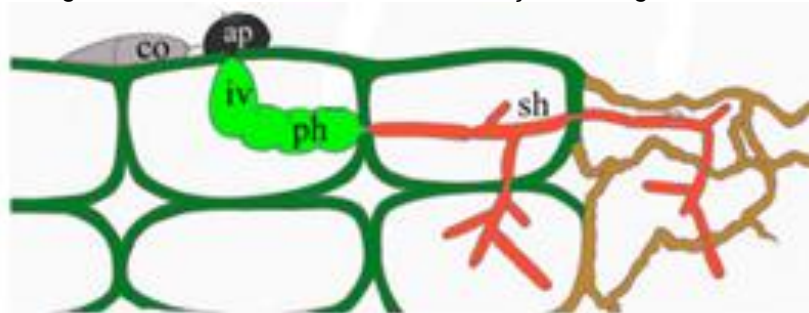
Distribuída no Brasil, a doença está presente principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Santa

Catarina. Visto que essa doença é causada por um microrganismo cuja capacidade de sobrevivência nos restos de cultura e no solo é elevada, a adoção do sistema de plantio direto pode aumentar significativamente a proliferação de inóculo no solo. Esta prática torna as lavouras de milho nesse sistema de cultivo mais suscetíveis à antracnose. A taxa de aumento da doença ocorre em função da quantidade inicial de inóculo presente nos restos de cultura, podendo reduzir a produção do milho em até 40% em cultivares suscetíveis sob condições ambientais favoráveis (EMBRAPA, 2009). Em outras culturas *Colletotrichum spp.* Podem causar perdas de até 100% de frutos estocados (DEAN et al, 2012). Um fator complicador relacionado à ocorrência da antracnose é a inexperiência da maioria dos técnicos no reconhecimento dos sintomas dessa doença em campo, permitindo que ela ocorra em severidade elevada (EMBRAPA, 2009).

A maioria dos fitopatógenos pode ser classificada baseando-se em sua colonização. Patógenos biotróficos invadem as células vivas do hospedeiro e as reprogramam, utilizando diversos sinais moleculares, para utilizar os nutrientes da planta em seu próprio benefício (HORBACH et al, 2011; BANCAL et al, 2012). Patógenos necrotróficos matam as células hospedeiras para o seu desenvolvimento e se nutrem dos tecidos mortos da planta (HORBACH et al, 2011). Alguns patógenos, como *C. graminicola*, têm um comportamento hemibiotrófico, sendo considerado um intermediário entre os dois extremos (TORRES et al, 2016).

No hospedeiro, inicialmente *C. graminicola* tem um comportamento biotrófico, uma fase curta caracterizada pela produção de estruturas de infecção, como as vesículas de infecção e hifas primárias, mantendo as células do hospedeiro vivas e não causando danos macroscópicos (KRIJGER et al, 2008; MÜNCH et al, 2008). Sequencialmente, há um desenvolvimento agressivo – fase necrotrófica – com a formação de hifas secundárias, cujo crescimento é acelerado, colonizando e matando as células do hospedeiro (Figura 3) (TORRES et al, 2016). Assim, os danos são visíveis somente após a fase necrotrófica do fungo.

Figura 3 - Modelo de estruturas de infecção de *C. graminicola*.



Nota: co: conídio; ap: apressório; iv: vesícula de infecção; ph: hifa primária; sh: hifa secundária.
 Fonte: Oliveira-Garcia e Deising, 2013.

O patógeno forma estruturas de infecção específicas durante e após as fases de infecção. Após contato com o hospedeiro, os esporos germinam, com a formação de um curto tubo germinativo e apressório. Com a maturação do apressório, uma camada de melanina é formada na parede ao redor da estrutura e alguns compostos são sintetizados em maiores concentrações (MENDGEN; DEISING, 1993; DEISING et al, 2000; KUBO et al, 2000). Essa melanização ajuda na permeabilização da parede celular das células do hospedeiro, a qual, em conjunto com a pressão do apressório, resulta na geração de uma pressão de turgor. A transição da fase de formação do apressório para a fase biotrófica é caracterizada por um aumento na expressão de genes que codificam proteínas secretadas (TORRES et al, 2016), o fungo produz uma série de enzimas com alto potencial de degradação de parede celular, por exemplo, celulose, hemiceluloses e pectinas (O'CONNELL et al, 2012). Essas enzimas contribuem para a penetração inicial do fungo no hospedeiro, agindo em conjunto com a pressão mecânica realizada pelo apressório (DEISING et al, 2000).

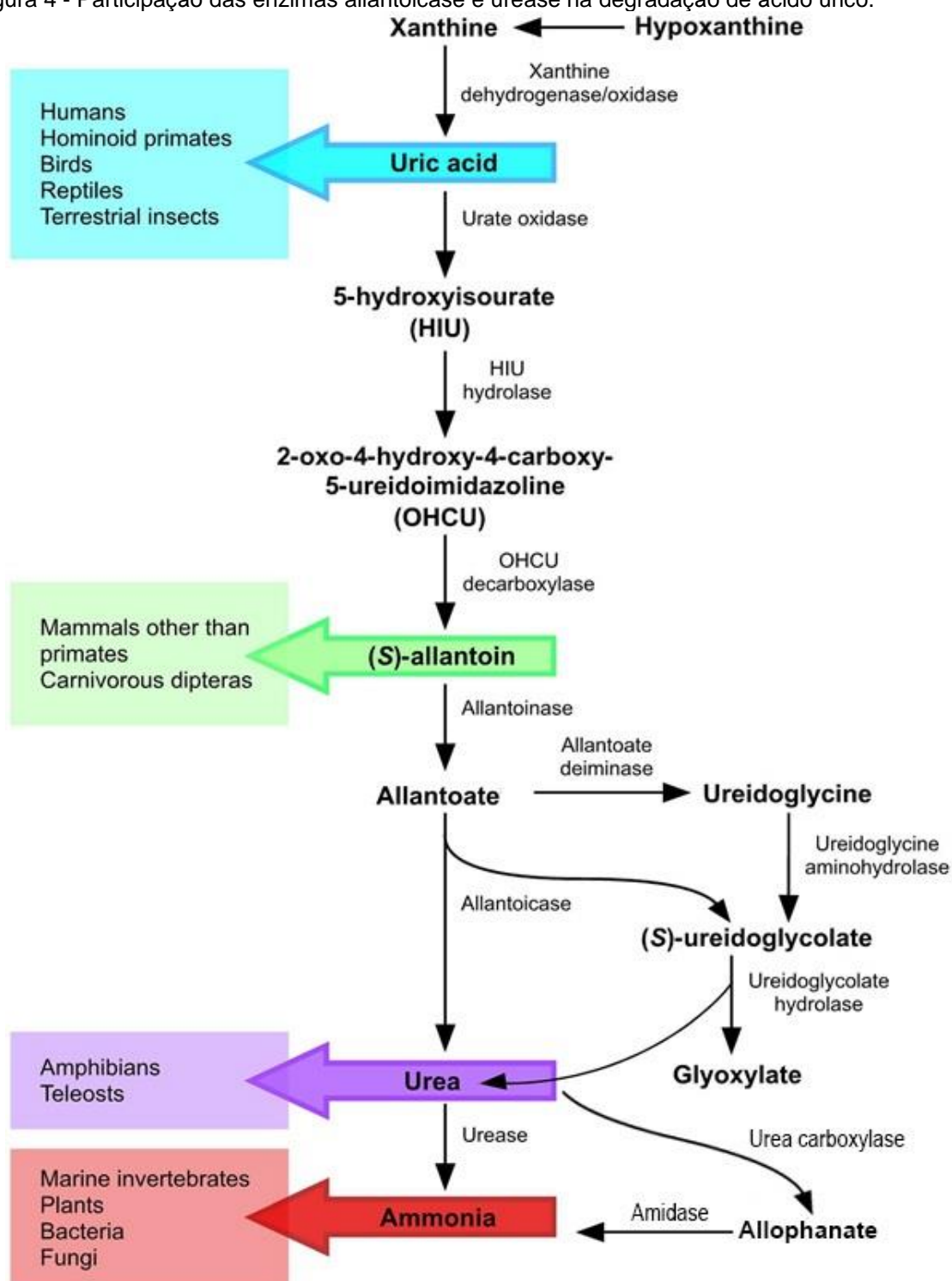
3.2 UTILIZAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO, ENZIMAS UREASE E ALLANTOICASE

Segundo Lee e colaboradores (2013a), fungos patogênicos podem se estabelecer em uma variedade de ambientes. Somente em infecções em humanos, os nutrientes disponíveis podem variar dependendo do local ou da patofisiologia da infecção. No entanto, uma característica comum para a adaptação nesses diferentes ambientes é a habilidade de metabolizar os nutrientes disponíveis, incluindo fontes

de nitrogênio, carbono e metais essenciais. As fontes de nitrogênio podem influenciar transições morfológicas específicas, esporulação sexual e assexual e fatores de virulência. Todas essas mudanças fisiológicas conferem vantagens seletivas para a sobrevivência, proliferação e colonização de fungos. Fungos patogênicos podem apresentar diferentes fenótipos associados à patogenicidade de acordo com a regulação do catabolismo de nitrogênio.

De forma geral, a degradação de purinas é bem conservada em animais, fungos, plantas e bactérias. O produto nitrogenado final de diferentes organismos é resultado de perdas de funções das enzimas uricase (também chamada de ureato oxidase), allantoinase e allantoicase durante processos evolutivos. A enzima uricase catalisa a oxidação de ácido úrico em 5-hydroxiisorato (HIU), a enzima allantoinase degrada alantoína em alantoato e a enzima allantoicase, alantoato em ureia (Figura 4). A degradação de ácido úrico em alantoína ocorre pela produção de dois intermediários, HIU e 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU). HIU é degradado espontaneamente em OHCU e subseqüentemente em alantoína, por reações lentas não enzimáticas (LEE et al, 2013b).

Figura 4 - Participação das enzimas allantoicase e urease na degradação de ácido úrico.



Fonte: adaptado de Lee et al, 2013b

O composto alantoina foi observado pela primeira vez por Buniva e Vauquelin, em 1800, em fluido amniótico de vacas. Depois de sua descoberta, a substância foi observada em diversos materiais biológicos, incluindo urina de

cachorros, gatos e coelhos e então se descobriu ser excreção da maioria dos mamíferos. Exceções são os humanos, primatas superiores e um número reduzido de mamíferos, cuja atividade de uricase, allantoinase e allantocase se perdeu durante os eventos evolutivos, devido à ação antioxidante do ácido úrico ao sistema nervoso (ZHANG et al, 2014).

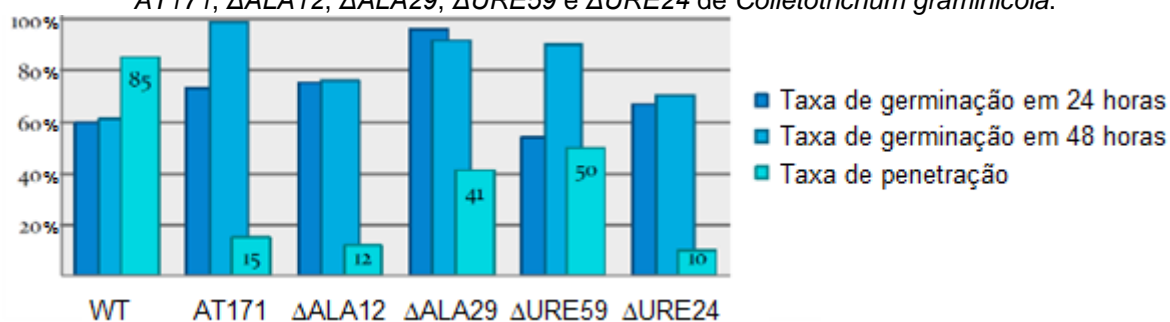
Estudos de Fagard e colaboradores (2014) mostram que a forma de nitrogênio disponível para plantas pode afetar o sistema de defesa. Porém os mecanismos moleculares que controlam essa defesa por limitação de nitrogênio são desconhecidos. Sabe-se que a disponibilidade de nitrogênio pode afetar a interação planta-patógeno modificando a virulência (FAGARD et al, 2014). Por exemplo, amônio como única fonte de nitrogênio pode reprimir a capacidade de penetração das espécies *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* e *Magnaporthe oryzae* (LOPEZ-BERGES et al, 2010). Por outro lado, a bactéria *Dickeya dadantii* tem a produção de pectinases reprimida pela baixa concentração de amônio (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al, 1992). Os resultados obtidos por Montalbini (1991) mostram que a atividade de allantoinase está fortemente ligada à infecção de folhas de feijão pelo fitopatógeno *Uromyces phaseoli*.

Plantas e algumas bactérias apresentam uma rota alternativa de degradação de alantoato em ureia (VOGELS; DRIFT, 1976). Alantoína e alantoato são os compostos nitrogenados solúveis mais estáveis presentes nas plantas, eles podem ser metabolizados sequencialmente pelas enzimas allantocase e urease, liberando nitrogênio na forma de ureia, ureidoglucolato e em sua forma assimilável, amônio, além de glioxilato (LEULLIOT et al, 2004). Durante a infecção e colonização, os fitopatógenos necessitam de outras enzimas para metabolizar as fontes de nitrogênio disponíveis. Isso ocorre por que dentro das células vegetais existem diferentes fontes de nitrogênio, como nitrito e nitrato (SCHLÜTER et al, 2012).

A enzima allantocase está presente em diversas bactérias, fungos e plantas, além de alguns animais, como peixes e anfíbios (LEULLIOT et al, 2004). Münch e colaboradores (2011) relacionaram essa proteína à penetração do fitopatógeno *C. graminicola* em folhas de milho. Seguindo o trabalho de Münch e colaboradores (2011), Glienke e colaboradores (2015) obtiveram mutantes com deleção dos genes responsáveis pela produção de urease e allantocase em *C. graminicola*. Como observado na Figura 5, tanto os mutantes com deleção (do gene responsável pela

produção de allantoicase - $\Delta ALA12$ e $\Delta ALA29$ – e de urease – $\Delta URE24$ e $\Delta URE59$), quanto o transformado *AT171* obtido por Münch e colaboradores (2011) apresentaram taxa de penetração (P) menor que a linhagem selvagem (WT), enquanto as taxas de germinação dos conídios em 24 horas (G24) e em 48 horas (G48) não foram afetadas.

Figura 5 – Taxas de germinação de conídios e de penetração da linhagem selvagem e dos mutantes *AT171*, $\Delta ALA12$, $\Delta ALA29$, $\Delta URE59$ e $\Delta URE24$ de *Colletotrichum graminicola*.



Fonte: Glienke et al. (2015).

As ureases codificadas por bactérias ocorrem normalmente em um cluster de três genes, codificando três subunidades: alpha, beta e gamma. Já em eucariotos um único gene codifica a proteína urease, que é uma fusão das subunidades bacterianas (CARTER et al, 2009). Em algumas bactérias, as subunidades beta e gamma são fusionadas e codificadas por um único gene, enquanto em outras, estas subunidades estão ausentes. Alguns organismos apresentam mais de uma cópia do gene, porém são exceções a soja (WITTE, 2005) e os microrganismos *Fusarium oxysporum* e *F. graminearum* (STROPE et al, 2011). No genoma de *Colletotrichum graminicola* apenas um gene é responsável pela produção da enzima urease, conforme anotado por O'Connell e colaboradores (2012). Existem poucos estudos sobre a enzima allantoicase em microrganismos, especialmente em fitopatógenos. Wong e Wolfe (2005) mostraram que existe uma única cópia do gene responsável pela produção da enzima allantoicase em *Saccharomyces cerevisiae*. O'Connell e colaboradores (2012) também anotaram um único gene para a enzima allantoicase no genoma de *C. graminicola*.

Tanto em células procarióticas, quanto em células eucarióticas, uma proteína só entra na via de secreção se possuir um sinal específico para o encaminhamento.

Chamado de peptídeo sinal, este é uma extensão da região amino-terminal da proteína e é removido por enzimas uma vez que a proteína tenha seu direcionamento realizado (HEIJNE, 1990; ALBERTS et al, 2008). Todas as ureases produzidas por plantas e bactérias estudadas até o momento, são derivadas de uma mesma enzima ancestral. Todas ureases, exceto de *Helicobacter pylori*, são citoplasmáticas (KREJEWSKA, 2009).

H. pylori infecta a camada mucosa do estômago de humanos e para sobreviver neste ambiente ácido, a enzima urease encontra-se associada à parede. Assim, com a degradação das fontes de nitrogênio e consequente produção de amônio, o pH do meio aumenta, tornando-o propício para seu desenvolvimento (PHADNIS et al, 1996). Segundo O'Connell e colaboradores (2012), as proteínas urease e allantoicase em *C. graminicola* não são secretadas, porém não existem estudos de localização dessas proteínas em *C. graminicola*. Enquanto a allantoicase produzida por leveduras, como *Candida fomatata* e *Candida tropicalis*, são citoplasmáticas (TAKADA; TSUKIJI, 1987; LARGE et al, 1990), as produzidas por peixes e sapos são localizadas em peroxissomos no citoplasma (FUJIWARA et al, 1989, USUDA et al, 1994).

Utilizando análise de RNASeq, O'Connell e colaboradores (2012) não encontraram diferenças significativas na expressão dos genes responsáveis pela produção de urease e allantoicase nas fases de apressório, hifas biotróficas e hifas necrotróficas. Por outro lado, estes autores encontraram taxas de expressão do gene responsável pela produção de allantoicase superiores ao do gene responsável pela produção de urease nas três fases analisadas. Entretanto, não há informações quanto à expressão destes genes em esporos ou tubos germinativos. Torres e colaboradores (2016) analisaram por RNAseq um grupo de 828 genes de *Colleotrichum graminicola*, não incluindo os genes responsáveis pela produção das proteínas urease e allantoicase, e relatam que esses genes têm diferentes níveis de expressão dependendo da fase de desenvolvimento em que o fungo se encontra. Por exemplo, aproximadamente 19 % dos genes analisados são expressos somente na fase de formação de apressórios. Enquanto quase todos os genes que tem um aumento de expressão na fase biotrófica em relação à fase de formação de apressório, também aumentam sua expressão na fase necrotrófica (TORRES et al, 2016).

Strope e colaboradores (2011) mostraram que alguns microrganismos utilizam outras proteínas para a obtenção de amônio a partir de ureia. A proteína ureia amidolase pode quebrar a ureia em amônio e dióxido de carbono em duas etapas, enquanto urease faz o mesmo em um processo de etapa única (NAVARATHNA et al, 2010). A proteína ureia amidolase pode se apresentar em uma forma reduzida, chamada de ureia carboxilase, que não tem um domínio amidase anexada a ela. Essa proteína é encontrada em diversas espécies de fungos (NAVARATHAN et al, 2010), algas verdes (HODSON et al, 1975) e também foi caracterizada em bactérias (KANAMORI et al, 2004). Strope e colaboradores (2011) observaram que das 64 espécies de fungos analisados por eles, todas as espécies que não possuem a sequência do gene de ureia amidolase, possuem a sequência para o gene responsável pela produção de urease, porém algumas espécies, como *Fusarium verticillioides*, *Nectria haematococca* e *Magnaporthe oryzae*, possuem ambos os genes.

Os trabalhos realizados por Strope e colaboradores (2011) também demonstra que fungos pertencentes à classe Dothideomycetes não têm a sequência do gene responsável pela produção de ureia amidolase, porém contêm as sequências de amidase e de ureia carboxilase, contudo em localizações bem distantes no genoma (STROPE et al, 2011). Todos os fungos analisados por Strope e colaboradores (2011), exceto os da classe Saccharomycotina, contêm o gene responsável pela produção de urease. Já todos da classe Sordariomycetes, exceto por *Neurospora crassa* possuem ambos os genes, ureia amidolase e urease. O'Connell e colaboradores (2012) anotaram duas cópias de ureia carboxilase para *C. graminicola*, que pertence à classe Sordariomycetes, porém nenhuma sequência de amidase que não seja secretada está adjacente a esses genes. Entretanto, Strope e colaboradores (2011) citam que a proteína ureia carboxilase é facilmente dispensável para muitas espécies de microrganismos.

A via alternativa na degradação de alantoato em ureia via alantoato deiminase (Figura 4), encontrada em *Cryptococcus neoformans*, não é comum para todos microrganismos. O'Connell e colaboradores (2012) não citam a presença de alantoato deiminase no genoma de *C. graminicola*.

3.3 ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES

Uma maneira de entender a função de genes é analisar o perfil de expressão por microarranjos a partir de DNA complementar (WISMAN; OHLROGGE, 2000), por oligonucleotídeos (ZHU; WANG, 2000; REDMAN et al, 2004) ou *amplicons* (KIM et al, 2003). Novos métodos de *arrays* foram desenvolvidos para analisar o genoma por inteiro, e dessa forma, responder diversas questões sobre estrutura dos genes e seus perfis de expressão (XIAO et al, 2010). Técnicas de microarranjos têm sido utilizadas para analisar características genômicas, como estrutura da cromatina (SCHUBELER et al, 2004; GENDREL et al, 2005), sítios de modificações no DNA (KURDISTANI et al, 2004; CHANG; PIKAARD, 2005) e sítios de ligação DNA-proteína (REN et al, 2000; THIBAUD-NISSEN et al, 2006).

Para estudos de patogenicidade, as técnicas de *arrays* e hibridização diferencial apresentam uma desvantagem, já que diante de um grande número de genes regulatórios, poucos genes são essenciais durante a patogênese (FANG; DEAN, 2000). Genes com funções relacionadas à patogenicidade, como por exemplo, genes que controlam a morfogênese durante a infecção ou envolvidos na produção de toxinas podem ser analisados por experimentos de *knock-out* (FANG; DEAN, 2000; JANSEN et al, 2005; LYSØE et al, 2006).

Além dos métodos baseados em predição da função dos genes, existem métodos de avaliação que não possuem um alvo, possibilitando a identificação de genes desconhecidos, como possíveis alvos de controle. A mutagênese aleatória em combinação com uma seleção dos mutantes por fenótipos pode ser muito eficiente para esse objetivo. Duas técnicas para mutagênese aleatória são bem estudadas: a *Restriction Enzyme-mediated Mutagenesis* (REMI) (KAHMANN; BASSE, 1999) e a *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation* (ATMT) (LU et al, 1994). A técnica REMI tem como maior desvantagem a alta taxa de mutações sem marcação (MÜNCH et al, 2008). Por outro lado, o protocolo de ATMT é amplamente utilizado e capaz de evitar este problema, utilizando um vetor contendo o gene de resistência à higromicina entre as margens esquerda e direita do T-DNA, sendo que a transformação de fungos pode ser desencadeada incluindo a acetoseringona no meio de crescimento (COVERT et al, 2001; MULLINS et al, 2001).

Outra metodologia para estudar as funções dos genes é analisar seus padrões de expressão *in vivo* quanto à localização, momento de expressão ou condições de cultura, utilizando genes repórteres. A técnica utiliza a integração aleatória de cassetes contendo o gene repórter sem promotor no genoma e o monitoramento de sua expressão para identificar genes, promotores e intensificadores (SPRINGER, 2000), fusão de promotor-gene repórter ou gene alvo-gene repórter a partir de um gene específico, transformando em um organismo e monitorando os padrões de expressão (LI et al, 1994; MANNERS et al, 1998; SANTAMARIA, 2001; VICENTE-AGULLO, 2004, KOO et al, 2007). A inserção do cassete pode ocorrer de tal maneira que a função de algum gene pode ser interrompida (KOO et al, 2007), podendo então levar a uma alteração de fenótipos (RAJANI; SUNDARESAN, 2001).

As proteínas fluorescentes são ferramentas importantes que têm revolucionado a biologia celular nas últimas décadas, principalmente no estudo de células vivas (FREITAG et al, 2004). Esses genes podem servir como marcadores moleculares, pois normalmente, sua visualização não requer substratos ou cofatores e podem ser empregados em diversos organismos (CZYMMEK et al, 2005; ISHIKAWA, 2009). Vários genes que codificam proteínas fluorescentes são descritos para visualizar padrões de expressão genética, e esses diferem por fluorescer em diferentes comprimentos de onda podendo ser observados em diferentes colorações. Os genes repórteres que podem ser utilizados incluem o *green fluorescent protein (GFP)*, *bacterial β -glucuronidase (GUS)* e *firefly luciferase (Luc)* (KOO et al, 2007).

Destes, o *GFP* é um marcador com distinção e mensuração fácil para o crescimento de fungos, bactérias, plantas e animais (CHALFIE et al, 1994; CASPER; HOLT, 1996; LUDIN et al, 1996). É derivado da hidromedusa *Aequorea victoria*, caracterizada por emitir fluorescência verde em excitação por luz ultravioleta (UV) (CODY et al, 1993; CRANFILL et al, 2016). Sua fluorescência é derivada de sua estrutura terciária, chamada de *beta-can*, a qual possui em seu interior a região cromófora responsável pela fluorescência. Suas principais vantagens residem no fato de o fluoróforo fazer parte da cadeia peptídica, então além de luz e oxigênio, não é necessário nenhum aditivo para fluorescer (CONTINA et al, 2017). Além disso, sua visualização é possível sem o rompimento de tecidos ou lise celular (CHIU et al,

1996). Esta proteína é pequena e estável em condições adversas, como temperaturas superiores a 65 °C e faixas de pH entre 3 e 12 (YANG et al, 1996).

Apesar da boa expressão do *GFP* em alguns organismos (e. g. *Escherichia coli*), há dificuldades de expressão da proteína em plantas e mamíferos. Em fungos filamentosos, a mesma dificuldade existe, porém a proteína *GFP* foi otimizada por mutações que resultaram na formação muito mais rápida de fluoróforos (MAOR et al, 1998), o chamado *eGFP* (enhanced *GFP*) contém mutações que induzem o aumento da intensidade de fluorescência, sendo possível sua detecção em fungos filamentosos (LORANG et al, 2001; PÖGGLER et al, 2003).

O *GFP* pode ser monitorado durante o processo de infecção dos fungos na planta, sendo possível verificar sua distribuição e estimar sua biomassa. Oren e colaboradores (2003) demonstraram que na interação entre o fungo *Fusarium verticillioides* e plantas de milho, esse marcador pode fornecer diversas informações, auxiliando a explicar as diferenças que ocorrem nas interações em diversas fases da infecção. Além disso, o *GFP* já foi utilizado em trabalhos para investigar a mancha manteigosa e monitorar *Colletotrichum gloeosporioides* em café (ARRESTO et al, 2012), para realizar a quantificação de *Trichoderma harzianum* no solo (ORR; KNUDSEN, 2004) e investigar genes que influenciam a virulência do fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* em feijão. Nesse fungo a produção da proteína *Itf1* é influenciada pela ausência ou presença de luz durante o cultivo do fungo, e quando fusionada ao GFP, foi possível identificar que a proteína é produzida no núcleo celular de hifas de infecção de *Botrytis cinerea* (SCHUMACHER et al, 2014).

Técnicas de transferência de genes, como a transformação genética, são extremamente eficientes para a caracterização molecular da especialização fisiológica de fungos (PANACCIONE et al, 1988). Os fungos hemibiotróficos, como *C. graminicola*, são acessíveis às técnicas moleculares convencionais, incluindo transformação sítio dirigida e mutagênese aleatória (EPSTEIN et al, 1998), que em combinação com a seleção de mutantes por fenótipos se tornam técnicas importantes para a busca de genes alvo para o desenvolvimento de estratégias de controle de patógenos (MÜNCH et al, 2008). Existem diversas metodologias para se inserir um DNA exógeno no genoma de um microrganismo, como a transformação de uma célula inteira (contendo parede celular intacta) via acetato de lítio, por

eletroporação, biobalística, ATMT ou por meio de protoplastização (BERG; MARUTHACHALAM, 2015).

Para preparação de células para a transformação muitas vezes é necessário obter células desprovidas de parede celular, tornando-as receptoras e permeáveis à entrada de DNA exógeno. Para isso é comumente utilizado o método de protoplastização de células fúngicas utilizando várias enzimas degradadoras da parede celular (MULLINS; KANG, 2001). Especialmente em fungos filamentosos, que apresentam espessa parede celular, a protoplastização parece ser uma etapa essencial para uma transformação bem sucedida (POSSIEDE, 2004). O estado fisiológico das células, o estabilizador osmótico e o composto lítico são os principais fatores envolvidos na protoplastização e são essenciais para um alto rendimento de protoplastos (PEBERDY, 1991). A proporção de diferentes polímeros presentes na parede celular de diferentes espécies de fungos é muito variada, e ainda diferem entre parede celular de esporos e hifas, dificultando assim o estabelecimento de um único protocolo (BERG; MARUTHACHALAM, 2015).

O processo de protoplastização definido para um fungo pode não funcionar para outro, cada espécie geralmente requer condições específicas (ZHANG et al, 2016). Por exemplo, Zhang e colaboradores (2016) obtiveram 2 transformantes de *Lecanicillium lecanii* para a proteína *Cdep1:GFP* a partir de 256 colônias. *L. lecanii* é um fungo que causa doenças em insetos. Neste estudo, apesar da adição de um promotor forte para o gene ter uma superexpressão, os transformantes produziram menos conídios quando comparados com a linhagem selvagem. Os autores justificaram essa diferença devido a uma menor produção de micélio quando inoculados nos insetos mortos se comparados com a linhagem selvagem. Já Lüberck e colaboradores (2002) conseguiram 6 transformantes expressando a proteína GFP a partir de 30 colônias analisadas de *Clonostachys rosea*. No mesmo trabalho, Lüberck e colaboradores (2002) também obtiveram 4 transformantes expressando a proteína fluorescente GUS, a partir de 20 colônias analisadas do mesmo fungo. Apesar de não ser uma transformação sítio dirigida, os autores obtiveram um alto rendimento quando comparado com Zhang e colaboradores (2016).

Na mutagênese dirigida em fungos filamentosos é necessário construir um cassete com uma região DNA-flanqueadora homóloga, entre 500 pb e 1 kb. Essa

construção favorece a frequência da recombinação homóloga (0,5-30 %) (MICHIELSE, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

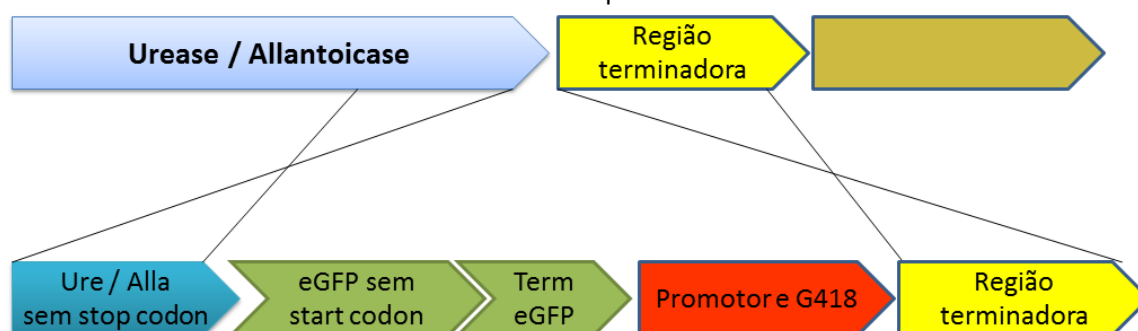
O isolado utilizado no presente trabalho foi *Colletotrichum graminicola* M01 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (Curitiba/PR, Brasil). A linhagem foi mantida em repiques sucessivos em meio de cultura *Oat Meal Agar* (OMA) (Anexo A) em câmara de crescimento a 23 ± 2 °C.

4.2 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE FUSÃO PARA AS PROTEÍNAS ALLANTOICASE E UREASE COM A PROTEÍNA FLUORESCENTE *eGFP*

A construção dos cassetes foi realizada por DJ-PCR (*Double-joint* PCR), seguindo a metodologia proposta por Yu e colaboradores (2004). Para fusão das proteínas alvo (allantoicase e urease) com a proteína *eGFP* foram utilizados três fragmentos: Região final do gene alvo (sem stop códon), *eGFP* (sem start códon) + gene de resistência e região 3'-terminal (Figura 6). O fragmento *eGFP*+Geneticina para os mutantes *URE1:eGFP* foi amplificado a partir do vetor pGFPG418 (Figura 7a) e o fragmento *eGFP*+Higromicina para os mutantes *ALA1:eGFP*, foi obtido do vetor pSH1.6EGFP modificado de Oliveira Garcia e Deising (2013) (Figura 7b). Os produtos foram verificados em eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com kit de purificação de PCR (ThermoFisher Scientific). Para a ligação dos fragmentos, foi realizada PCR de fusão, sem *primers* (Yu et al, 2004), e contendo os reagentes descritos na Tabela 1. Para a confirmação da fusão dos 3 fragmentos foi realizada uma PCR utilizando os *primers nest-F* e *nest-R* (Tabela 2). Os cassetes foram purificados e ligados ao vetor pJET, utilizando *CloneJET PCR Cloning Kit*, seguindo protocolo do fabricante (ThermoFisher Scientific) e transformados em *E. coli* por choque térmico (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A construção do cassete foi confirmada por sequenciamento, utilizando os primers pJETR, pJETF, HygProbeF, HygProbeR e GfpFusionCgUreaseF (Tabela 2) para o cassete da allantoicase e os primers Urease-nest-F, Urease-nest-R, GFPG418-F e CgGentaProbeR2 (Tabela 2) para o cassete da urease. A reação de PCR foi conduzida com 0,3 U/reação de

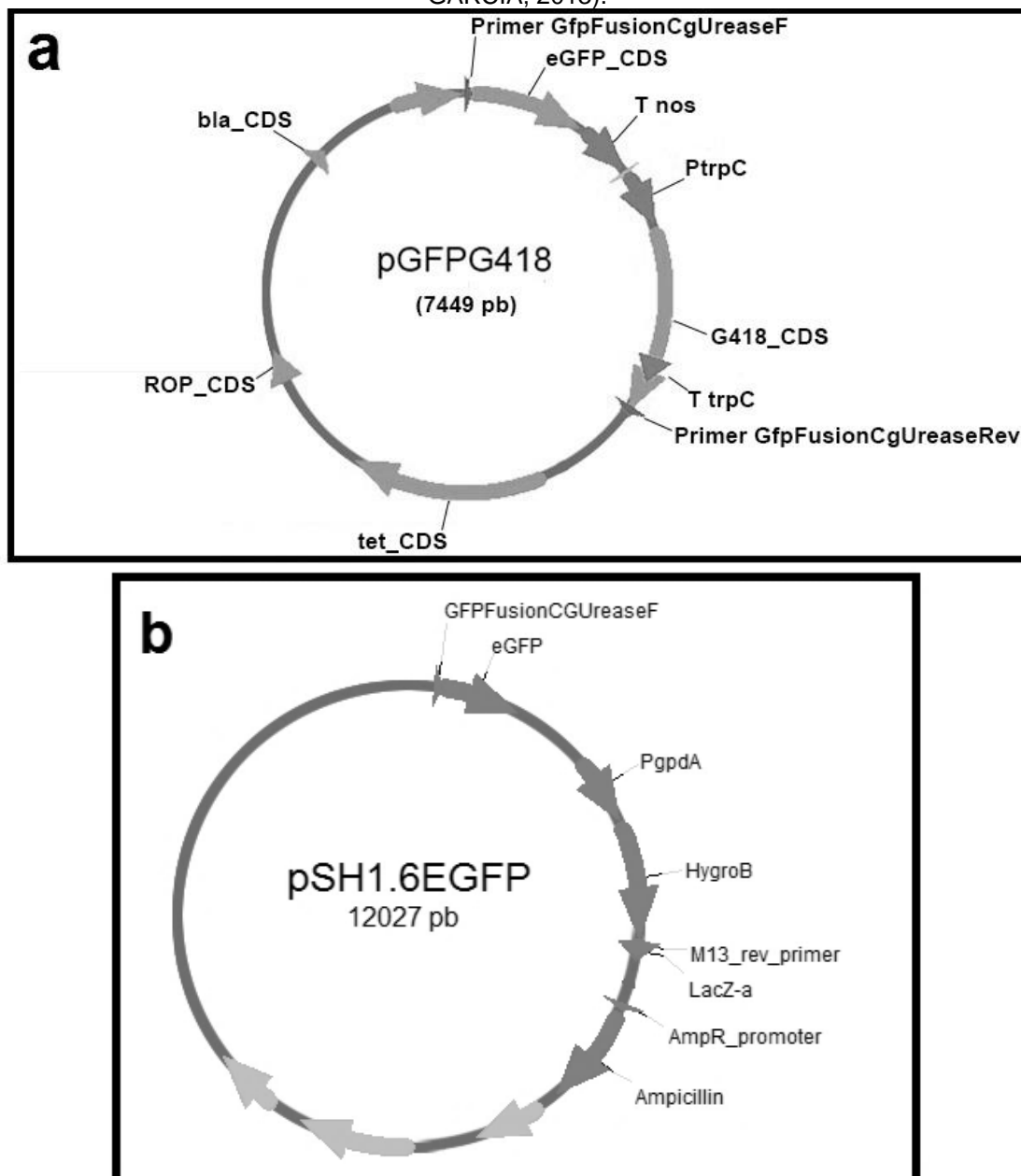
TopTaq Master Mix (QIAGEN), 0,2 μ M de cada primer em um volume final de 12,5 μ L e 50 ng de DNA molde. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos à temperatura indicada pelo fabricante (60 °C), e extensão a 72 °C por 1 min/Kb, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi purificado utilizando as enzimas Exo1 e FastAP (GE Healthcare, USA). Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye Terminator v3.1, seguindo as orientações do fabricante. O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando o polímero Sephadex G50. A leitura da reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Figura 6 – Cassete de fusão e estratégia de recombinação homóloga para fusão do *eGFP*+gene de resistência com as proteínas alvo.



Nota: GR, gene de resistência.
 Fonte: modificado de Glienke et al, 2015.

Figura 7 – Mapa dos vetores utilizados para construção dos cassetes de transformação. a) pGFPG418 (o autor); b) Mapa do vetor de transformação pSH1.6EGFP (modificado de OLIVEIRA-GARCIA, 2013).



Nota: Em a) *Primer GFPFusionCgUreaseF*, *primer forward* do vetor para o gene *eGFP*; *eGFP_CDS*, região codificante do gene *eGFP*; *T nos*, região terminadora do gene *eGFP*; *PtrpC*, região promotora do gene *G418* (confere resistência à geneticina); *G418_CDS*, região codificante do gene *G418*; *T trpC*, região terminadora do gene *G418*; *Primer GFPFusionCgUreaseRev*, *primer reverse* do vetor para a Geneticina; *tet_CDS*, região codificante do gene de resistência à tetraciclina; *ROP_CDS*, região codificante do gene de repressão de primer; *bla_CDS*, região codificante do gene de resistência à ampicilina. Em b) *GFPFusionCGUreaseF*, *primer forward* do vetor para o gene *eGFP*; *EGFP*, região codificante do gene *eGFP*; *PgpdA*, região promotora do gene que confere resistência à higromicina; *HygroB*, região codificante do gene que confere resistência à higromicina; *M13_rev_primer*, *primer reverse* do vetor para o gene higromicina; *AmpR_promoter*, promotor referente ao gene que confere resistência à ampicilina; *Ampicillin*, região codificante do gene que confere resistência à ampicilina.

Tabela 1 – Condições utilizadas para PCR da segunda etapa de DJ-PCR.

Proporção	Reagentes	Banda amplificada	
		Urease	Allantoicase
1x	Amplificado de região 5'- flanqueada purificado	1007 pb	952 pb
1x	Amplificado do gene de resistência purificado	2590 pb	3548 pb
3x	Amplificado de região 3' flanqueada purificado	930 pb	730 pb
	dNTP		
	Tampão PCR		
	Água destilada estéril		
	Polymerase de alta fidelidade (<i>Phusion</i>)		

Fonte: modificado de YU et al, 2004.

Tabela 2 – *Primers* utilizados no presente trabalho.

Nome dos Primers	Urease	Allantoicase	Etapas
Primer RF-F	5'GTCCACCATCAACGCTTTTCG3'	5'CCTGGGTGGAAAGATTCTTG3'	DU-PCR etapa 1
Primer RF-R + tailGFP	5'ctcctcgcccttgctcacATACACGTAAACGCTTGCGTC3'	5'ctcctcgcccttgctcacCGCCCTCTTTCCA AATACAC3'	
Primer eGFP+G418-F	5'GTGAGCAAGGGCGAGGAG3'		
Primer eGFP+G418-R + unitail / Primer eGFP+Hygro-unitail	5'aagctagtgcactccagacCCGTTGATCTGCTTGATCTCG3'	5'gtctggagtctcactagcttACGTTAAGTGAGAGGAAGCACAAAG3'	
Primer 3'-F + unitail	5'gtctggagtctcactagcttGCGGGTATAATGAGAGTGTG3'	5'gtctggagtctcactagcttACGTTAAGTGAGAGGAAGCACAAAG3'	
Primer 3'-R	5'TCATGGCGCGGCTAGTTGTTG3'	5'TGTGATGCGAGTTCCGGTGAG3'	
Primer-nest-F	5'CACACCTACCACACCGAAGG3'	5'AGATGAATGGTTTGCCGAGGC3'	DU-PCR etapa 3
Primer-nest-R	5'TCTCCTTAGTACACCGGCG3'	5'CAGCAGGCATACTTCCC GCATCT3'	PCR de screening
(1) CgUProbeNF	5'GTCCACCATCAACGCTTTTC G3'	-	
(2) GFP FusionCgU reaseF	5'GTGAGCAAGGGCGAGGAG3'	-	
(3) CgGentaProbe R2	5'GAGCCCCTGATGCTCTTCG3'	-	
(4) CgramUreFR	5'CACGTTTCGCTCTCATCTTC3'	-	
(5) CgramAllaSbF	-	5'CCTGGGTGGAAAGATTCTT3'	
(6) AllaGFPNested Forw	-	5'AGATGAATGGTTTGCCGAGGC3'	
(7) HygProbeR	-	5'CCATCGGCGCAGCTATTTAC3'	
(8) Alla3Cgram.R1	-	5'AGATGCGGGAAGTATGCCTGCTG3'	
CgGentaProbeF2	5'GGATTGCACGCAGGTTCTC3'	-	Sondas para o Southern Blot
CgGentaProbeR2	5'GAGCCCCTGATGCTCTTCG3'	-	
HygProbeF	-	5'GTCCCTGGTAGGCAGCTTTG3'	
HygProbeR	-	5'CCATCGGCGCAGCTATTTAC3'	
pJETF	5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3'		Primers pJET
pJETR	5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG3'		
A – CgramProbeUreF	5'TCCACGAGATCCAGGTTGAG3'	-	Primers sequenciamento
B – CgUProbeNF	5'GTCCACCATCAACGCTTTTCG3'	-	
C – CgUPNF	5'TCAAGCGGTACGTGTCCAAG3'	-	
D – CgUProbeNR	5'TTGGACACGTACCGCTTGAC3'	-	
E – GFPR	5'GCAGAACACCCCATCG3'	-	

Fonte: o autor.

4.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Colletotrichum graminicola*

Para a transformação genética, o isolado *C. graminicola* M01 foi cultivado em meio OMA e incubado a 23 °C, de 14 a 21 dias ou até produzir esporos. Os esporos foram obtidos através de lavagem com 1 mL de água, e a suspensão foi padronizada por contagem em câmara de Neubauer. Foram inoculados 5×10^5 esporos/mL em 250 mL de meio completo (Anexo A) em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL. O cultivo foi incubado em agitador do tipo *shaker* por 19-36 horas a 28 °C sob total ausência de luz e rotação de 200 rpm.

Após o período de incubação o cultivo foi filtrado em duas camadas de papel *Whatman* e em seguida verificou-se a presença de esporos em microscópio. O filtrado foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos para coletar os conídios (retido), e o sobrenadante foi descartado.

Os esporos foram ressuspensos em 10 mL de solução de protoplastização (Anexo B) e incubados em *shaker* a 30 °C, com rotação de 40-50 rpm por aproximadamente 4 horas. A presença de protoplastos foi verificada em microscópio. Os protoplastos foram coletados utilizando centrifugação a 800 g por 10 min a 4 °C sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado em 10 mL de solução STC (Anexo B), centrifugado novamente nas mesmas condições, e então, novamente, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de STC para concentração.

Quatro alíquotas de 250 µL foram separadas em tubos *falcons* de 15 mL em gelo e adicionou-se em dois tubos, 1-5 µg de DNA (máximo 50 µL), misturando-se bem, mas de forma gentil e incubando em gelo por 30 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução PEG (Anexo B), misturou-se bem e incubou-se em temperatura ambiente por

20 minutos. Foi adicionado 10 mL de meio de regeneração (0,6 % ágar – Anexo A) – ainda líquido, entre 45 e 50 °C – em tubo *falcon*. O meio foi imediatamente transferido para a superfície de placas previamente preparadas com meio de regeneração (1,5 % ágar – Anexo A). Duas placas foram utilizadas para os protoplastos com adição de DNA, sendo uma com e uma sem adição de 400 µg/mL de antibiótico (Geneticina – G418 – para os mutantes referentes à urease e higromicina para os mutantes referentes à allantoicase). Outras duas placas foram

utilizadas como controles sem adição de DNA. As placas foram incubadas por 7 a 10 dias a 23 °C em estufa B.O.D.

As colônias que cresceram nos tratamentos foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA (Anexo A) com 100 µg/mL do respectivo fungicida e incubadas por aproximadamente 7 dias. As colônias que cresceram nestas placas foram então transferidas para meio OMA sem adição de fungicida. As placas foram vedadas com fita *micropore* (3M) e incubadas a 23 °C com luz constante até esporulação. Para cada colônia foi realizada uma cultura monospórica, em que conídios foram suspensos em 2 µL de água e posteriormente diluídos em 1 mL de água. Esta suspensão foi diluída na proporção de 2:3 em água e 100 µL foram espalhados em placas com meio seletivo (BDA – fungicida específico 100 µg/mL) e incubados por até 7 dias a 23 °C. Recuperou-se colônias monospóricas isoladas, transferindo-as para placas com meio seletivo (BDA + fungicida específico 100 µg/mL).

As culturas foram repicadas em placas OMA sem fungicida, em placas descartáveis de 40 mm de diâmetro, mantidas a 23 °C por até 21 dias para induzir esporulação.

4.4 SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES

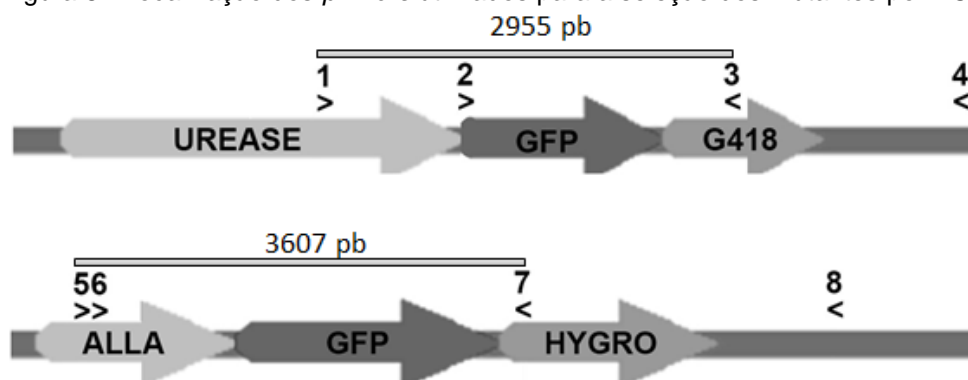
Os transformantes obtidos foram caracterizados por PCR, *Southern Blot* e microscopia de fluorescência (expressão da proteína *eGFP*), visando-se a seleção de mutantes fusionados *URE1:eGFP* e *ALA1:eGFP* apresentando uma única cópia do cassete no local correto do genoma (inseridos via recombinação homóloga) e apresentando fluorescência, e mutantes ectópicos para as análises subsequentes.

4.4.1 Seleção por PCR

Com intuito de verificar quais linhagens apresentam o cassete na posição correta, foi realizada a seleção dos mutantes através de PCR. Os *primers outside* (Tabela 2 – *primers* 1 e 4; 5, 6 e 8 – Figura 8) anelam no interior do gene alvo ou na sua região flanqueadora, porém em uma região não presente no cassete de fusão. Uma PCR utilizando um *primer outside* e um *primer inside* (anelando na região do

cassete, fora do gene alvo – Tabela 2 – *primers* 2, 3 e 7) não amplifica um fragmento para a linhagem selvagem e para os mutantes ectópicos (mutante com inserção aleatória do cassete de fusão no genoma). Na linhagem selvagem, não existe homologia com o *primer inside*, e para os mutantes ectópicos, o *primer inside* pode ou não formar par com o *primer outside* (Figura 9), amplificando ou não um fragmento, porém diferente do tamanho esperado para os mutantes fusionados.

Figura 8 - Localização dos *primers* utilizados para a seleção dos mutantes por PCR.

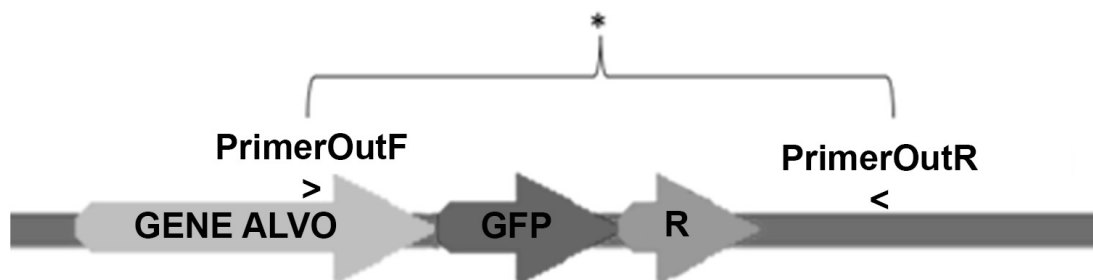


NOTA: Barra: tamanho dos fragmentos amplificados para as linhagens mutantes utilizando o par de *primers outside* e *inside*; *G418*: gene que confere resistência à geneticina; *ALLA*: gene responsável pela produção da proteína allantoicase; *Hygro*: gene que confere resistência à higromicina. *Primers*: 1: CgUProbeNF; 2: *GFPFusionCgUreaseF*; 3: CgGentaProbeR2; 4: CgramUreFR; 5: CgramAllaSbFG; 6: *AllaGFPNestedForw*; 7: HygProbeR; 8: *Alla3Cgram.R1* (Tabela 2). >, *Primer Forward*; <, *Primer reverso*.

Fonte: o autor.

Por outro lado, para os mutantes fusionados com o cassete posicionado de forma correta no genoma (via recombinação homóloga), deve ser amplificado um fragmento de tamanho conhecido, sendo 2955 pb para *URE1:eGFP* e 3607 pb para *ALA1:eGFP* (Figura 8). Outra PCR utilizando dois *primers outside* amplifica fragmentos de tamanhos diferentes para as linhagens fusionadas e linhagens ectópicas e selvagem, sendo o fragmento esperado maior para as linhagens fusionadas conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Exemplo de localização dos *primers* utilizados para PCR de seleção em linhagens de *C. graminicola* fusionadas e ectópicas ou selvagem.



NOTA: R: gene que confere resistência à antimicrobiano; *: fragmento amplificado, 4552 pb para os mutantes *URE1:eGFP* e 5160 pb para os mutantes *ALA1:eGFP*, e 2034 para a linhagem selvagem e mutantes ectópicos no caso da transformação *URE1:eGFP* e 1635 pb no caso da transformação *ALA1:eGFP*, pois não tem os genes *GFP* e de resistência.

Fonte: o autor.

As reações de PCR foram conduzidas com 0,3 U/reacção de TopTaq Master Mix (QIAGEN), 0,2 μ M de cada primer em volume final de 12,5 μ L e 50 ng de DNA genômico – a extração foi realizada conforme Sugui e Deising (2002). As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, 30 segundos à temperatura de anelamento indicada pelo fabricante (60 °C), e extensão a 72 °C por 1 min/kb, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1 %.

4.4.2 Determinação por *Southern Blot* do número de cópias dos cassetes inseridos nos mutantes

A identificação do número de cópias dos cassetes inseridas no genoma de cada linhagem foi realizada através de *Southern Blot*. Para o mesmo, a extração do DNA genômico do micélio de *C. graminicola* foi realizada como descrito por Sugui e Deising (2002).

O DNA genômico (10 μ g) dos mutantes e selvagem foi digerido utilizando enzima de restrição específica para cada cassete, seguindo as instruções do fabricante (Fermentas International Inc.). Para os mutantes *URE1:eGFP*, o DNA genômico foi digerido, em duas reações separadas, utilizando as enzimas *HindIII* e *XhoI*. Para os mutantes *ALA1:eGFP*, o DNA genômico foi digerido utilizando as

enzimas *Bam*HI, *Bgl*III e *Pst*I. O DNA digerido foi separado por 3 horas em gel de agarose 0,7% (m/v), em tampão TAE (Anexo B), depurinado – 30 min em HCl 0,25 M – e desnaturado – 30 min em NaOH 0,4 M – e foi realizada a transferência capilar alcalina para uma membrana de *nylon* carregada positivamente (GE Healthcare) utilizando tampão de transferência SSC 20x (3 M NaCl, 300 mM sodium citrate, pH 7.0) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; EISEL et al, 2008). A fixação do DNA na membrana de nylon foi realizada por Croslinking utilizando exposição a luz U.V. por 45 segundos (120 J) em forno da marca Life Technologies do modelo BLX-254.

Sondas com *Digoxigenin-dUTP-labeled*, que anelam no gene responsável pela resistência ao antimicrobiano, foram sintetizadas através de PCR utilizando os *primers* específicos para as sequências dos genes que conferem resistência à geneticina e higromicina (Tabela 2). Para isso utilizou-se tampão de PCR 1x, 2 µL de PCR Labeling Mix (ROCHE) – conforme instrução do fabricante – 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer e 0,3 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 20 µL e 200 ng de DNA molde (vetor). As condições utilizadas para a reação foram desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a 60 °C, e extensão a 72 °C por 1 min/kb, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A hibridização e a detecção da sonda foram realizadas conforme descrição do fabricante (ROCHE) e as membranas foram expostas em um filme de raio-X (marca AGFA) por 16 horas. A presença de banda única do tamanho esperado foi o critério utilizado para seleção de mutantes fusionados para as próximas etapas.

4.4.3 Análise dos mutantes em microscopia de fluorescência

A expressão das proteínas allantoicase e urease foi verificada pela fluorescência do gene repórter *eGFP* através de microscopia utilizando-se catáfilo de cebolas inoculados com esporos dos mutantes *URE1:eGFP* e *ALA1:eGFP*.

Foram utilizados fragmentos de 0,5 cm² da epiderme do catáfilo da cebola inoculados com 10 µL com pelo menos $5 \cdot 10^4$ conídios em 0,01 % (v/v) em Tween 20 (MÜNCH et al, 2011; OLIVEIRA-GARCIA; DEISING, 2013). Os fragmentos foram incubados em meio ágar-água contendo ampicilina (100 µg/mL) – com finalidade de se evitar o crescimento de bactérias –, sob ausência de luz, a 23 °C por 4, 24, 48 e

72 horas. A microscopia de fluorescência foi realizada com filtros Fit C de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 100 ms. As condições de exposição foram determinadas pela comparação da fluorescência dos mutantes com a linhagem selvagem (ausência de fluorescência) e um mutante de *C. graminicola* que produz a proteína *eGFP* constitutivamente (*TGFP*), ambos pertencentes à coleção de culturas do LabGeM da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil). As imagens foram editadas pelo *software* ImageJ 1.49v (*National Institutes of Health, USA*).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM A PROTEÍNA *eGFP* EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para determinar em que momento do desenvolvimento e infecção pelo fungo as enzimas são produzidas bem como a localização subcelular, todos os mutantes fusionados e três ectópicos para cada transformação (referente à enzima urease e à enzima allantoinase) selecionados nas etapas anteriores, foram utilizados.

Os mutantes selecionados foram avaliados através da inoculação em folhas destacadas de milho da variedade P1630AX (Pioneer). Foram cultivadas seis plantas de milho por vaso (aproximadamente 1,5 L) por 18 dias. O substrato utilizado foi uma mistura na proporção de 6:4 de terra (Riga Snikers) com vermiculita expandida (Natura in Vita Indústria), autoclavado três vezes em dias consecutivos. A cultura foi mantida em câmara do tipo Fitotron da marca Conviron (modelo CMP6050) a 22 °C e umidade de 70 %RH.

Foram utilizados segmentos de aproximadamente 10 cm da terceira folha, inoculadas com 10 µL contendo pelo menos $5 \cdot 10^4$ conídios em solução 0,01 % (v/v) de Tween 20 (MÜNCH et al, 2011; OLIVEIRA-GARCIA; DEISING, 2013). As folhas foram incubadas em papel *Whatman* umedecido, sob ausência de luz, a 23 °C e avaliadas após 4, 24, 48 e 72 horas. As folhas foram fotografadas e submetidas à microscopia de fluorescência com filtros Fit C de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 100 ms. Os mutantes foram comparados com um mutante de

C. graminicola capaz de produzir a proteína *eGFP* constitutivamente (*TGFP*) e a linhagem selvagem. As imagens foram editadas com o *software* ImageJ 1.49v (*National Institutes of Health, USA*).

Além disso, o mutante *URE1:eGFP4*, o mutante *ALA1:eGFP8*, a linhagem selvagem e o transformante *TGFP* foram inoculados na epiderme de catáfilo da cebola sob condições semelhantes ao item 4.4.3 e analisados em 24, 48 e 72 horas. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com *software* de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE). Modelo da Câmera: CoolCube 1 - Metasystems. As imagens foram tratadas pelo *software* VSViewer v 2.1.102 (*MetaSystems GmbH, Altlussheim, Germany*), sendo elas compostas de 10 fotos em diferentes campos Z (*merged*) tanto de fotos de campo claro (DIC), quanto de fotos de epifluorescência (FITC).

4.6 ANÁLISE DE SINTOMAS EM FOLHAS DE MILHO

Com objetivo de verificar se os mutantes fusionados produzem sintomas semelhantes aos produzidos pela linhagem selvagem, foram realizados três experimentos independentes, com inóculo em folhas destacadas de milho da variedade P1630AX (Pioneer) produzidos conforme descrito no item 4.5.

Foram utilizados segmentos de aproximadamente 10 cm da terceira folha de plantas de 18 dias, em duplicata, inoculadas com 10 µL da suspensão contendo pelo menos $5 \cdot 10^4$ conídios em 0,01 % (v/v) de Tween 20 (MÜNCH et al, 2011; OLIVEIRA-GARCIA; DEISING, 2013). Os segmentos foram inoculados sob as mesmas condições utilizadas para microscopia de fluorescência. Após o terceiro dia, as folhas foram fotografadas a cada 24 horas durante 5 dias. Além disso, devido aos resultados obtidos, dois mutantes *URE1:eGFP* (4 e 50) foram inoculados em solução de Tween 20 0,01 % suplementado com 10 mM de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). Como controle, foram utilizadas a linhagem selvagem de *C. graminicola* e 2 mutantes com deleção para cada um dos genes responsáveis pela produção de urease e de allantoicase ($\Delta URE24$, $\Delta URE59$, $\Delta ALA12$ e $\Delta ALA29$) (Glienke et al, 2015).

4.7 ANÁLISE FUNCIONAL DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM O GENE *eGFP*

A fim de determinar a correta codificação dos genes das enzimas urease e allantoicase após fusão com o gene *eGFP* e verificar a atividade das enzimas traduzidas fusionadas à proteína *eGFP*, foram realizadas análises dos mutantes fusionados quanto a utilização de fontes de nitrogênio, e por meio de sequenciamento, bem como análises *in silico* das enzimas.

4.7.1 Utilização de fontes de nitrogênio

A avaliação dos mutantes fusionados quanto à utilização de fontes de nitrogênio foi realizada pelo crescimento em meios de cultura através de duas metodologias.

Na primeira foi avaliada, via indicador de pH, a capacidade dos mutantes em produzir amônio, utilizando-se meios semissólidos com restrição em nitrogênio. Para os mutantes *URE1:eGFP* e ectópicos a fonte de nitrogênio utilizada no meio foi ureia (meio ureia – Anexo A), e para a avaliação do mutante *ALA1:eGFP* e ectópicos a fonte de nitrogênio foi alantoína (meio alantoína – Anexo A), uma vez que o composto alantoato não é comercializado. Ambos meios de cultura contém Azul de Bromotimol como indicador de pH. Desta forma, a produção de amônio torna o meio alcalino, alterando sua coloração de amarelo-esverdeado para azul, indicando a atividade das enzimas urease ou allantoicase. Foram realizados dois experimentos independentes. Os mutantes foram incubados em triplicata a 23 °C, sob ausência de luz, por um período de até 7 dias.

Na segunda metodologia utilizada foi avaliado o crescimento micelial dos mutantes em meio semissólido *Yeast Nitrogen Base* (YNB – Anexo A) suplementado com 10 mM de diferentes compostos da via de degradação do ácido úrico (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio). Os fungos foram cultivados a 23 °C, sob ausência de luz, por 10 dias em triplicata. O crescimento micelial foi avaliado após 3, 5, 7 e 10 dias e fotografadas no quinto e no décimo dia.

Nas duas metodologias foram utilizadas como controles a linhagem selvagem e os mutantes deletados (Glienke et al, 2015) para os dois genes independentes ($\Delta URE24$, $\Delta URE59$, $\Delta ALA12$ e $\Delta ALA29$).

4.7.2 Sequenciamento do local de inserção de mutantes *URE1:eGFP*

A fim de verificar a existência de mutações que alterem a fase de leitura da proteína urease, e conseqüentemente perda de atividade, foi realizado sequenciamento da região de inserção do cassete no momento da recombinação homóloga dos mutantes *URE1:eGFP4* e *50*. Para isso, o DNA genômico foi extraído conforme protocolo de Sugui e Deising (2002). Fragmentos de DNA dos dois mutantes foram amplificados utilizando-se os *primers* CgramProbeUreF (3'TCCACGAGATCCAGGTTGAG5') e *GFP*R (3'GCAGAACACCCCATCG5'). A reação de PCR foi conduzida com 0,3 U/reação de TopTaq Master Mix (QIAGEN), 0,2 µM de cada primer em volume final de 12,5 µL e 50 ng de DNA molde. As condições de amplificação foram de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos à temperatura indicada pelo fabricante (60 °C), e extensão a 72 °C por 1 min/Kb, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. A purificação e sequenciamento seguiram o protocolo descrito no item 4.2. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas utilizando os *softwares* Mega 7.0 (KUMAR, 2015) e BioEdit v7.2.6 (HALL, 1999), e comparadas com a sequência de *C. graminicola* disponível no banco de dados GenBank (NW_007361658.1).

4.7.3 Análise *in silico* das enzimas da via de degradação do ácido úrico

Para verificar a presença da via alternativa de degradação de alantoato em ureia foi realizada uma comparação entre o gene responsável pela produção de alantoato deiminase de *Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata* (GenBank: LOC9306021) e o genoma de *Colletotrichum graminicola* (GenBank: GCF_000149035.1) utilizando a ferramenta de blast local (algoritmo tblastn) disponível no software BioEdit v7.2.6 (HALL, 1999).

Foi realizada uma análise *in silico* de predição de proteínas. As sequências de aminoácidos para *C. graminicola* foram obtidas no Uniprot (www.uniprot.org) e os códigos de acesso estão na Tabela 3. Para essa análise foram utilizadas ferramentas online disponíveis no ExPASy (GASTEIGE et al, 2003): MyHits (PAGNI et al, 2004), Swiss Model Workspace (BORDOLI et al, 2006; KIEFER et al, 2009; BIASINI et al, 2014) e Prosite (SIGRIST et al, 2012). Adicionalmente, foi realizada

uma predição para verificar a existência de peptídeo sinal em ambas as proteínas pela ferramenta online SignalP (EMANUELSSON et al, 2007).

Tabela 3 – Códigos de acesso das sequências de aminoácidos utilizados para análises *in silico* no banco de dados UNIPROT.

Microrganismo	Urease	Allantoicase
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	G2XSX2	G2YWW7
<i>Cajanus cajan</i>	A0A151SDR3	-
<i>Canavalia ensiformis</i>	P07374	-
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	A0A0F8B461	A0A0F8BW50
<i>Colletotrichum graminicola</i>	E3Q4H7	E3QMS8
<i>Diaporthe ampelina</i>	A0A0G2HPW9	-
<i>Eutypa lata</i>	M7THT7	M7TRU9
<i>Helicobacter pylori</i>	P69996	-
<i>Magnaporthe oryzae</i>	G4MYL6	G4ML65
<i>Ophiostoma piceae</i>	S3C769	S3CAH3
<i>Podospora anserina</i>	B2AYG6	B2B1B8
<i>Pseudozyma antarctica</i>	A0A081CL67	M9M794
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	P25335
<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	A0A084Q8S9	A0A084QIJ1
<i>Verticillium dahliae</i>	G2WT04	G2X0Y1

Fonte: o autor.

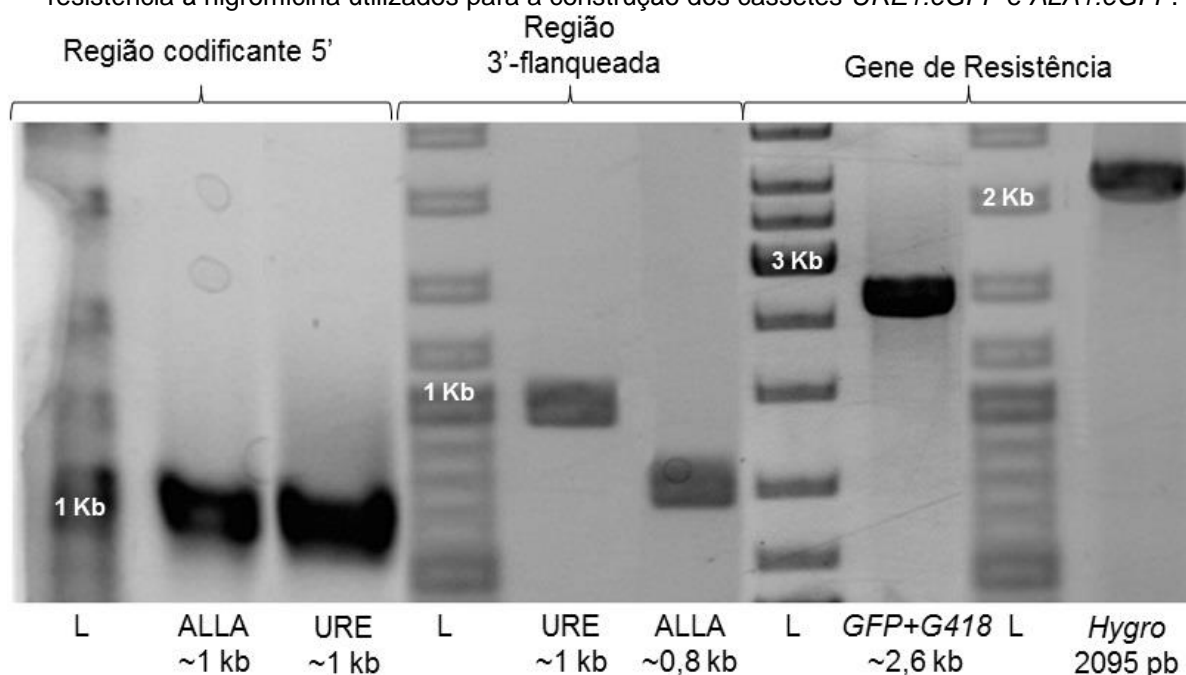
Sequências de aminoácidos de urease e allantoicase de outros organismos também foram obtidas na ferramenta online UniProt (www.uniprot.com.br) e foram alinhadas utilizando o Software Mega 7.0 (KUMAR, 2015). Também foram selecionadas sequências de fungos filogeneticamente próximos a *C. graminicola* (ZHANG et al, 2006) e disponíveis em banco de dados (Tabela 3).

5 RESULTADOS

5.1 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE FUSÃO *URE1:eGFP* E *ALLA1:eGFP*

Para fusão das proteínas alvo (allantoicase e urease) com a proteína *eGFP* inicialmente foram amplificados três fragmentos: Região final do gene alvo (sem stop códon) e a região 3'-terminal do gene alvo a partir do DNA genômico de *C. graminicola* (Figura 10) e o gene *eGFP* (sem start códon) + gene de resistência. O fragmento *eGFP*+Geneticina para os mutantes *URE1:eGFP* foi amplificado a partir do vetor *pGFPG418* (Figura 10) e o fragmento *eGFP*+Higromicina para os mutantes *ALA1:eGFP*, foi obtido do vetor *pSH1.6EGFP* modificado de Oliveira Garcia e Deising (2013) (Figura 10).

Figura 10 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR das região codificante 5', região 3'-flanqueada, do *GFP+G418* (gene que confere resistência à geneticina) e do gene que confere resistência à higromicina utilizados para a construção dos cassetes *URE1:eGFP* e *ALA1:eGFP*.

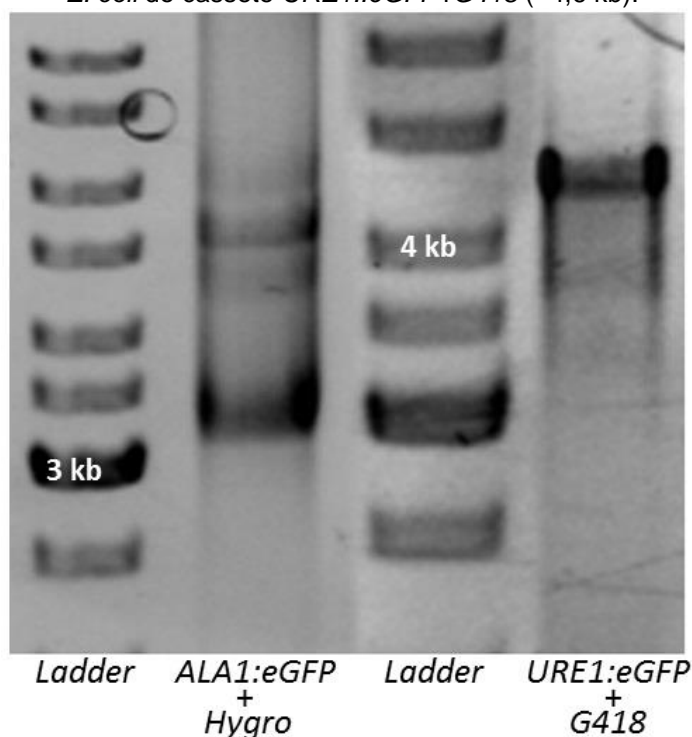


Fonte: o autor.

Foi realizada DoubleJoint PCR (DJPCR) para cada gene a fim de fusionar os fragmentos. Os produtos da DJPCR foram utilizados para reação de Nested PCR (Figura 11). A banda correspondente foi cortada e purificada do gel, ligada em pJET

e clonada em *E. coli*. Da clonagem foram selecionadas 12 colônias para cada gene, que foram submetidas à purificação plasmidial. Os plasmídios foram utilizados em reação de Nested PCR para cada gene, a fim de selecionar as colônias que continham o fragmento de tamanho correto (Figura 11). As colônias foram sequenciadas seguindo o item 4.2, com os primers pJETF e pJETR (Tabela 2). Uma vez comprovado que as colônias que continham as seqüências estavam corretas, foram armazenadas, e novas reações de Nested PCR foram realizadas e o produto obtido para cada gene foi purificado e utilizado para os eventos de transformação de *C. graminicola*.

Figura 11 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com os *primers nested* da produto de fusão do cassete *ALA1:eGFP+Hygro* (~3,8 kb) e do plasmídio extraído após clonagem em *E. coli* do cassete *URE1::eGFP+G418* (~4,6 kb).



Fonte: o autor.

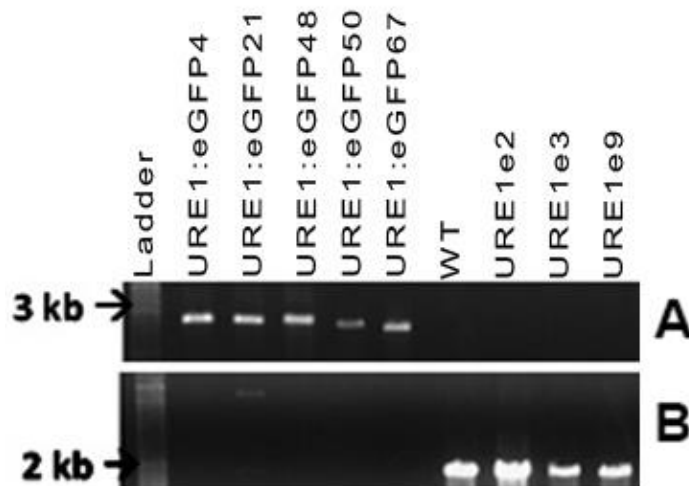
5.2 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE MUTANTES *URE1:eGFP*

Foram obtidos 52 colônias resistentes ao antimicrobiano Geneticina (G418) utilizando o cassete de fusão *URE1:eGFP*, que foram então avaliados por PCR, *Southern Blot* e microscopia.

5.2.1 Seleção por PCR

A PCR para caracterização dos mutantes como ectópicos ou fusionados foi realizada utilizando o par de *primers* CgUProbeNF (*Out*) e CgGentaProbeR2 (*In*) (Tabela 2), amplificando um fragmento de 2955 pb nos mutantes fusionados (*URE1:eGFP*), enquanto não houve amplificação na linhagem selvagem (WT) e nos ectópicos selecionados (*URE1e*) (Figura 12A). A confirmação das linhagens ectópicas foi realizada utilizando os *primers* CgUProbeNF (*Out*) e CgramUreFR (*Out*) (Tabela 2) com a amplificação de um fragmento de 2034 pb para a linhagem selvagem e para os mutantes ectópicos (Figura 12B).

Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com *primers* CgUProbeNF (*Out*) e CgGentaProbeR2 (*In*) (A) e CgUProbeNF (*Out*) e CgramUreFR (*Out*) (B) dos 5 mutantes fusionados (*URE1:eGFP*), 3 mutantes ectópicos (*URE1e*) e a linhagem selvagem (WT) de *C. graminicola*.



NOTA: Ladder, Marcador de peso molecular *Ladder* de 1kb; *URE1:eGFP*, transformantes fusionados; WT, linhagem *C. graminicola* M01; *URE1e*, ectópicos. Seta indica a banda do marcador.

Fonte: o autor.

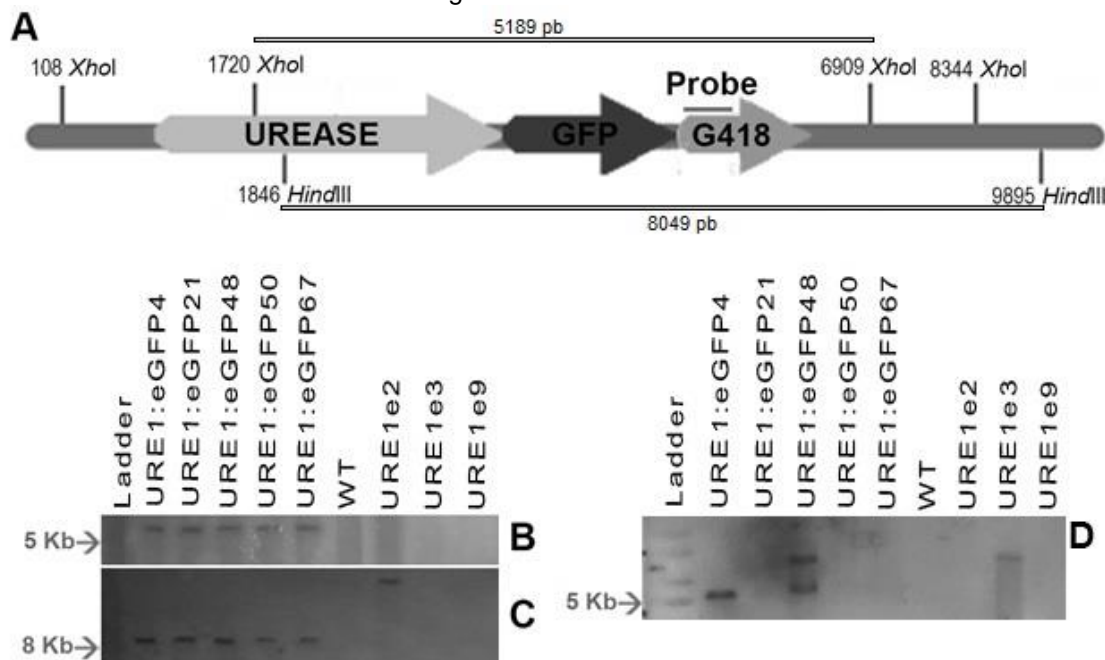
5.2.2 Determinação do número de cópias dos genes nos mutantes por *Southern Blot*

Na análise de *Southern Blot*, o DNA foi digerido com 2 enzimas de restrição separadamente, *XhoI* e *HindIII*, sendo que para a enzima *XhoI* foram realizadas duas análises de *Southern Blot* (Figura 13B e D).

O produto de digestão utilizando a enzima *XhoI*, quando hibridizado com a sonda para o gene da geneticina, gerou um fragmento único de 5189 pb para os fusionados (Figura 13A). Os mutantes fusionados *URE1:eGFP4*, 21, 50 e 67 apresentaram uma única cópia do cassete e banda de tamanho 5189 pb como esperado (Figura 13B), enquanto o mutante *URE1:eGFP48* apresentou duas bandas (Figura 13D). Somente o mutante ectópico *URE1e3* apresentou uma banda, porém de tamanho diferente do esperado para os mutantes fusionados (Figura 13D).

Para a análise de *Southern Blot* utilizando a enzima de restrição *HindIII* todos os mutantes *URE1:eGFP* apresentaram a banda esperada de 8049 pb para os fusionados (Figura 13A), quando hibridizados com a sonda para o gene geneticina (Figura 13C). Uma banda de tamanho diferente foi observada no mutante ectópico *URE1e2*.

Figura 13 – Análise de *Southern Blot* para os mutantes *URE1:eGFP* A) Localização dos cortes das enzimas de restrição e sonda utilizadas nas análises por *Southern Blot*. B e D) Análise de *Southern Blot* do DNA dos mutantes *URE1:eGFP* e linhagem *C. graminicola* M01, digeridas com *Xho*I. C) Análise de *Southern Blot* do DNA dos mutantes *URE1:eGFP* e linhagem de *C. graminicola* M01, digeridas com *Hind*III.



NOTA: G418: gene que confere resistência à geneticina; *URE1:eGFP*: mutantes fusionados; WT: linhagem selvagem de *C. graminicola* M01; *URE1e*: linhagens mutantes ectópicos de *C. graminicola*.
Fonte: o autor.

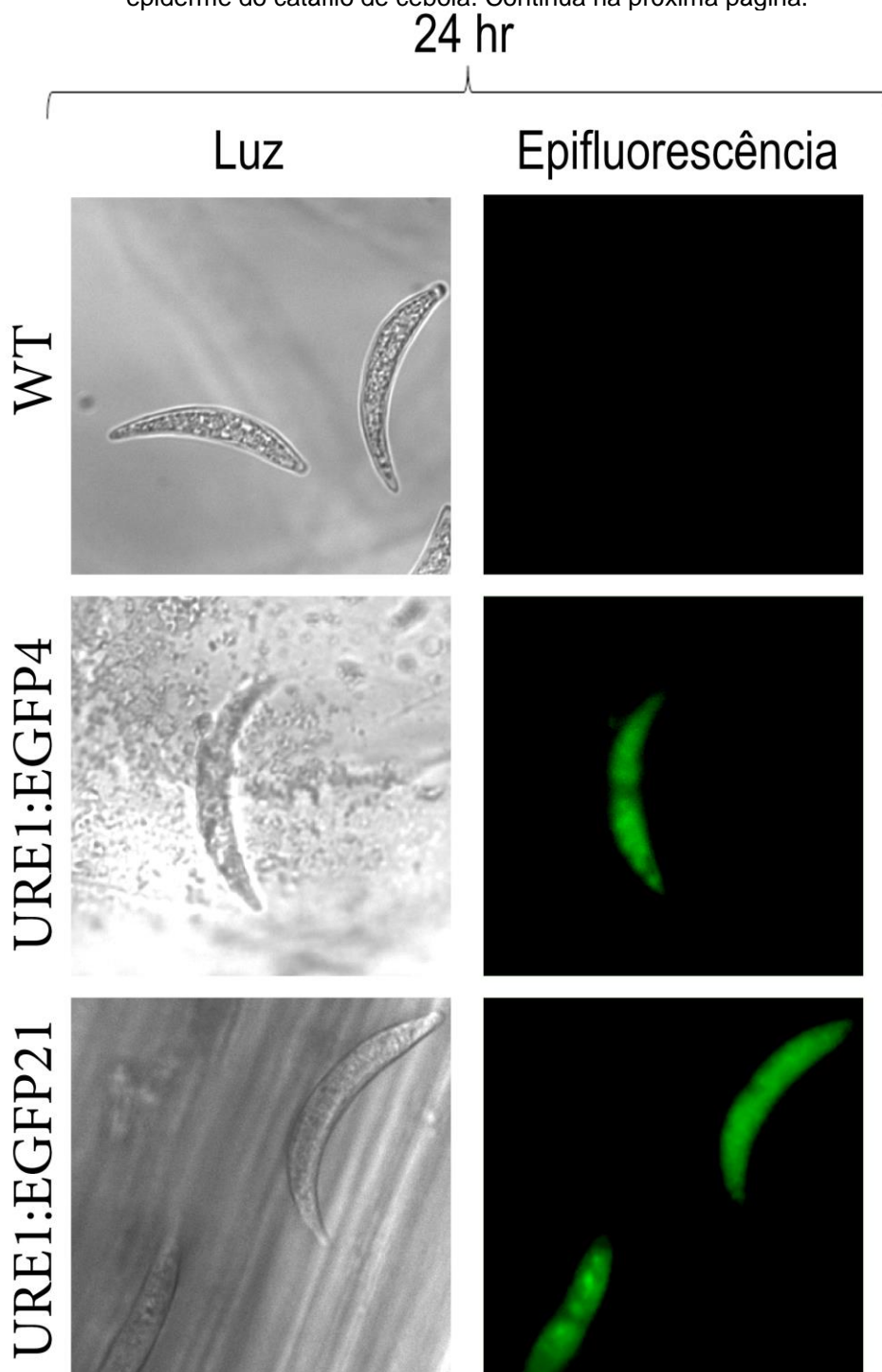
Essas análises por *Southern Blot* comprovam que os mutantes *URE1:eGFP*₄, ₂₁, ₅₀ e ₆₇ bem como os ectópicos *URE1e*₂ e *URE1e*₃ possuem apenas uma cópia do cassete inserido no genoma.

5.2.3 Análise por microscopia de fluorescência

Os mutantes *URE1:eGFP*₄, ₂₁, ₅₀ e ₆₇ e três mutantes ectópicos (*URE1e*₂, ₃ e ₉) foram avaliados em microscopia de fluorescência quanto à capacidade de expressão do gene *eGFP*. Como pode ser observado na Figura 14 todos os mutantes emitiram fluorescência em esporos, apresentando diferentes taxas de expressão.

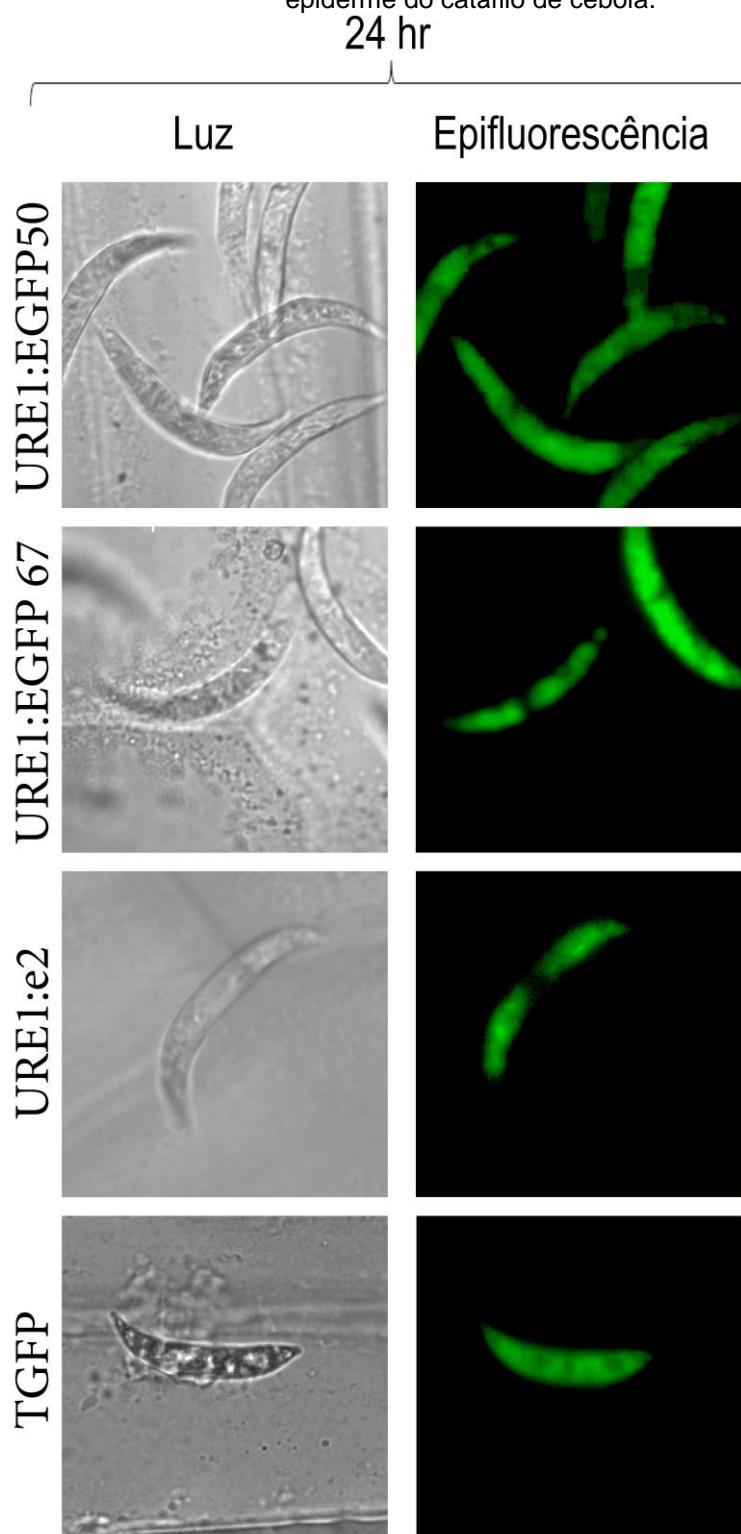
Com base nestes resultados, os mutantes fusionados *URE1:eGFP*₄, *URE1:eGFP*₂₁, *URE1:eGFP*₅₀ e *URE1:eGFP*₆₇, e os mutantes ectópicos *URE1e*₂, *URE1e*₃ e *URE1e*₉ foram selecionados para as demais análises.

Figura 14 - Fotomicrografias em campo claro (luz) e de epifluorescência de 5 mutantes *URE1:eGFP* (4, 21, 50 e 67), da linhagem selvagem (WT), mutante ectópico *URE1e2* e um mutante com expressão constitutiva do GFP (*TGFP*), 24 horas após inóculo de esporos de *C. graminicola* em epiderme do catáfilo de cebola. Continua na próxima página.



Fonte: o autor.

Figura 14 – Continuação. Fotomicrografias em campo claro (luz) e de epifluorescência de 5 mutantes *URE1:eGFP* (4, 21, 50 e 67), da linhagem selvagem (WT), mutante ectópico *URE1e2* e um mutante com expressão constitutiva do GFP (*TGFP*), 24 horas após inóculo de esporos de *C. graminicola* em epiderme do catáfilo de cebola.



Fonte: o autor.

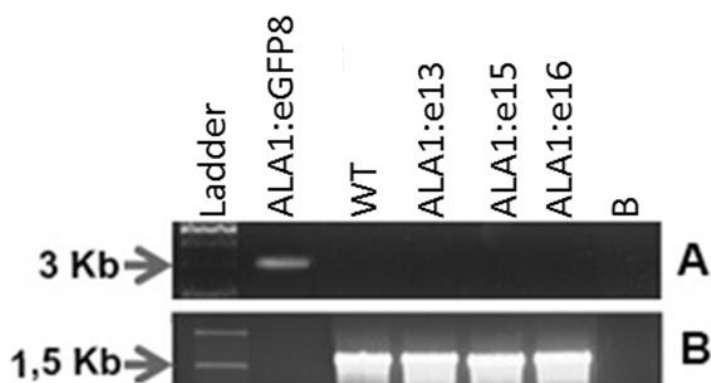
5.3 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS MUTANTES *ALA1:eGFP*

Foram obtidos 36 mutantes resistentes ao antimicrobiano higromicina utilizando o cassete de fusão *ALA1:eGFP*, que foram então avaliados por PCR, *Southern Blot* e microscopia.

5.3.1 Seleção por PCR

A PCR para identificação dos mutantes como fusionados ou ectópicos foi realizada utilizando o par de *primers* HygProbeR (*In*) e CgramAllaSbF (*Out*) (Tabela 2), e amplificou um fragmento de 3607 pb, esperado para a fusão *ALA1:eGFP* em um dos mutantes analisados (Figura 15A). A confirmação das linhagens ectópicas foi realizada utilizando os *primers* AllaGFPNestForw (*Out*) e Alla3Cgram.R1 (*Out*) (Tabela 2) com a amplificação de um fragmento de 1635 pb na linhagem selvagem e em 3 mutantes, os identificando como ectópicos, sendo então denominados de *ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16* (Figura 15B).

Figura 15 - Gel de eletroforese em agarose 1% dos produtos de PCR com *primers* CgramAllaSbF (*Out*) e HygProbeR (*In*) (A) e AllaGFPNestForw (*Out*) e Alla3Cgram.R1 (*Out*) (B) do mutante *ALA1:eGFP8*, dos mutantes ectópicos *ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16* e a linhagem selvagem (WT) de *Colletotrichum graminicola* M01.



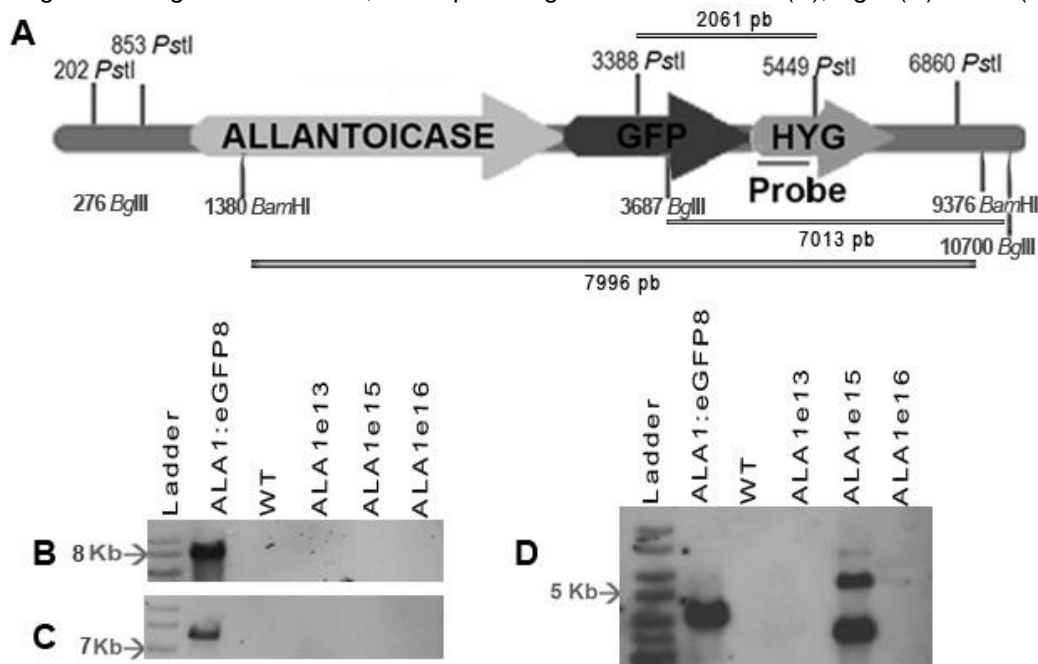
NOTA: Ladder: Marcador de peso molecular Ladder de 1kb; Setas indicam as bandas do marcador.
Fonte: o autor.

5.3.2 Determinação por *Southern Blot* do número de cópias do cassete inseridos nos mutantes

As linhagens fusionada *ALA1:eGFP8* e ectópicas caracterizadas por PCR foram submetidas à técnica de *Southern Blot* para verificar o número de cópias do cassete inserido no genoma. Para isto, o DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Bgl*III e *Pst*I (Figura 16A).

Espera-se que o produto de digestão utilizando a enzima *Bam*HI, *Bgl*III e *Pst*I, quando hibridizados com a sonda para o gene que confere resistência à higromicina, origine um fragmento único de tamanhos respectivos 7996 pb, 7013 pb e 2061 pb para os fusionados (Figura 16A). O mutante fusionado *ALA1:eGFP8* apresentou uma única cópia do cassete para as três análises (Figura 16B, C e D), porém com banda de tamanho aproximado de 4500 pb para a enzima *Pst*I (Figura 16D). Também para análise utilizando a enzima *Pst*I, o mutante ectópico *ALA1e15* apresentou mais de uma banda de tamanhos diferentes do esperado e o mutante ectópico *ALA1e16* apresentou uma banda diferente do tamanho esperado (Figura 16D), enquanto para as outras enzimas nenhuma ectópico apresentou banda (Figura 16B e C).

Figura 16 – A) Localização dos cortes das enzimas de restrição *Bam*HI, *Bgl*III e *Pst*I e sonda utilizadas na análise por *Southern Blot*. Análise de *Southern Blot* do DNA do mutante *ALA1:eGFP8*, linhagem selvagem de *C. graminicola* M01, e ectópicos digeridas com *Bam*HI (B), *Bgl*III (C) e *Pst*I (D).



NOTA: HYG: gene que confere resistência à higromicina; *ALA1:eGFP8*: mutante fusionado; WT: linhagem selvagem de *Colletotrichum graminicola* M01; *ALA1e*: linhagens mutantes ectópicos de *C. graminicola*.

Fonte: o autor.

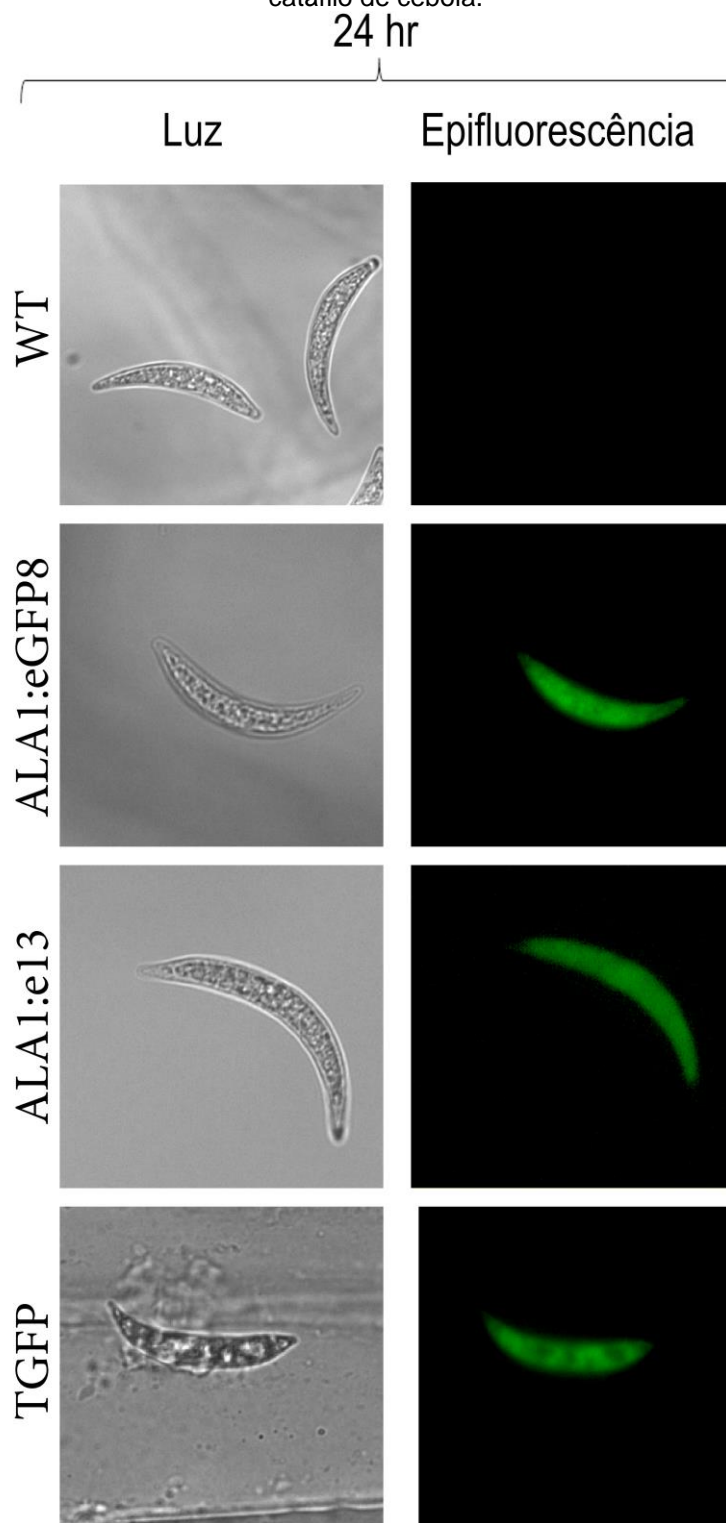
5.3.3 Análise por microscopia de fluorescência

O mutante *ALA1:eGFP8* e 3 os mutantes ectópicos foram avaliados em microscopia de fluorescência a fim de comprovar a transformação das linhagens e verificar a expressão do *eGFP*.

Todos os mutantes avaliados emitiram fluorescência em esporos (Figura 17).

Com base nestes resultados, os mutantes fusionado *ALA1:eGFP8* e ectópicos *ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16* foram selecionados para as demais análises.

Figura 17 – Fotomicrografias de campo claro (luz) e de epifluorescência dos mutantes *ALA1:eGFP8* e *ALA1e13* e da linhagem selvagem de *Colletotrichum graminicola* M01(WT) e do mutante *TGFP* que apresenta expressão constitutiva do gene *GFP* 24 horas após inóculo de esporos em epiderme de catáfilo de cebola.



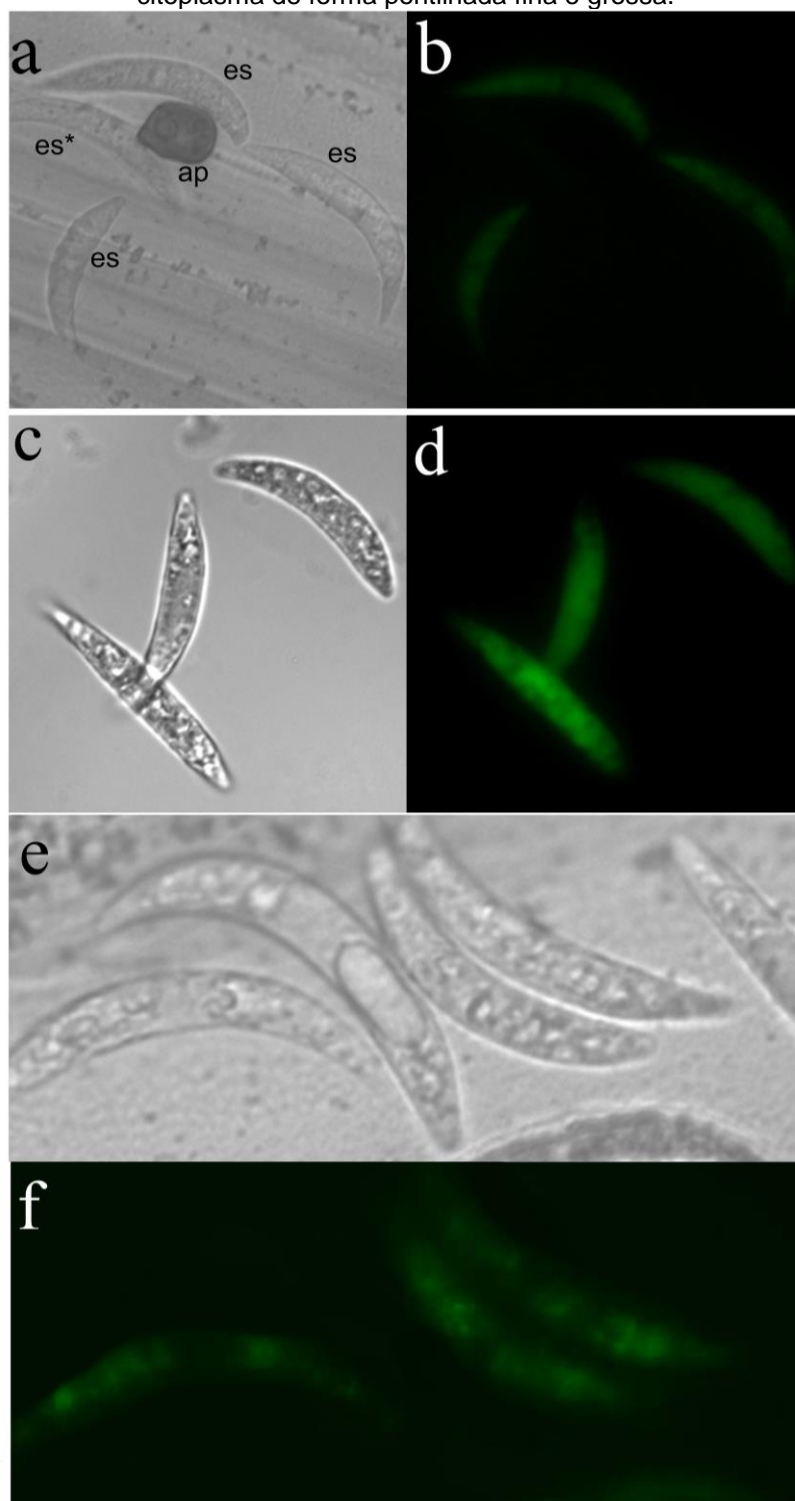
Fonte: o autor.

5.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS UREASE E ALLANTOICASE FUSIONADAS COM A PROTEÍNA *eGFP*

De acordo com as análises por PCR, *Southern Blot* e microscopia de fluorescência foram selecionados quatro mutantes *URE1:eGFP* (4, 21, 50 e 67) e o mutante *ALA1:eGFP8*. Os mutantes fusionados e três ectópicos para cada gene foram utilizados para a avaliação da expressão dos genes urease e allantoicase em folhas de milho (Figura 18 a Figura 21) em microscopia de fluorescência.

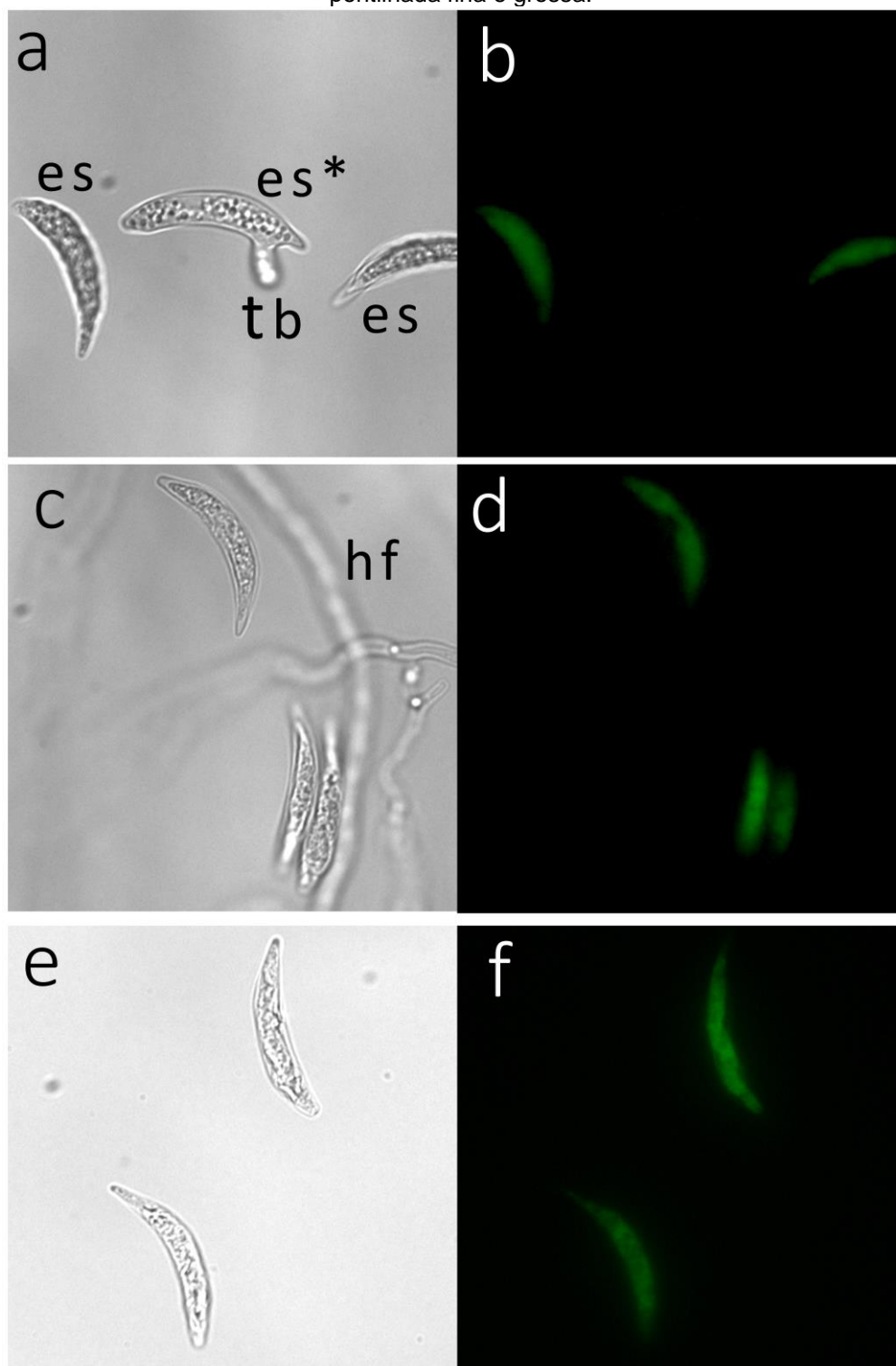
Observou-se fluorescência em esporos não germinados em todos os mutantes fusionados para ambos os genes, e nenhuma fluorescência em hifas necrotróficas e apressórios (Figura 20 e Figura 21). Tais mutantes emitiram fluorescência reduzida nos estágios iniciais de pré-penetração, ou seja, hifas de penetração e biotróficas, enquanto o mutante *TGFP* apresentou fluorescência em todos os estágios e tipos de estruturas analisadas.

Figura 18 - Microscopia de luz (a, c, e) e de epifluorescência (b, d, f) de esporos dos mutantes *URE1:eGFP67* (a, b), *URE1:eGFP21* (c, d) e *URE1:eGFP4* (e, f) de *C. graminicola*, 24 horas após inoculação em folhas de milho, apresentando fluorescência em esporos não germinados no citoplasma de forma pontilhada fina e grossa.



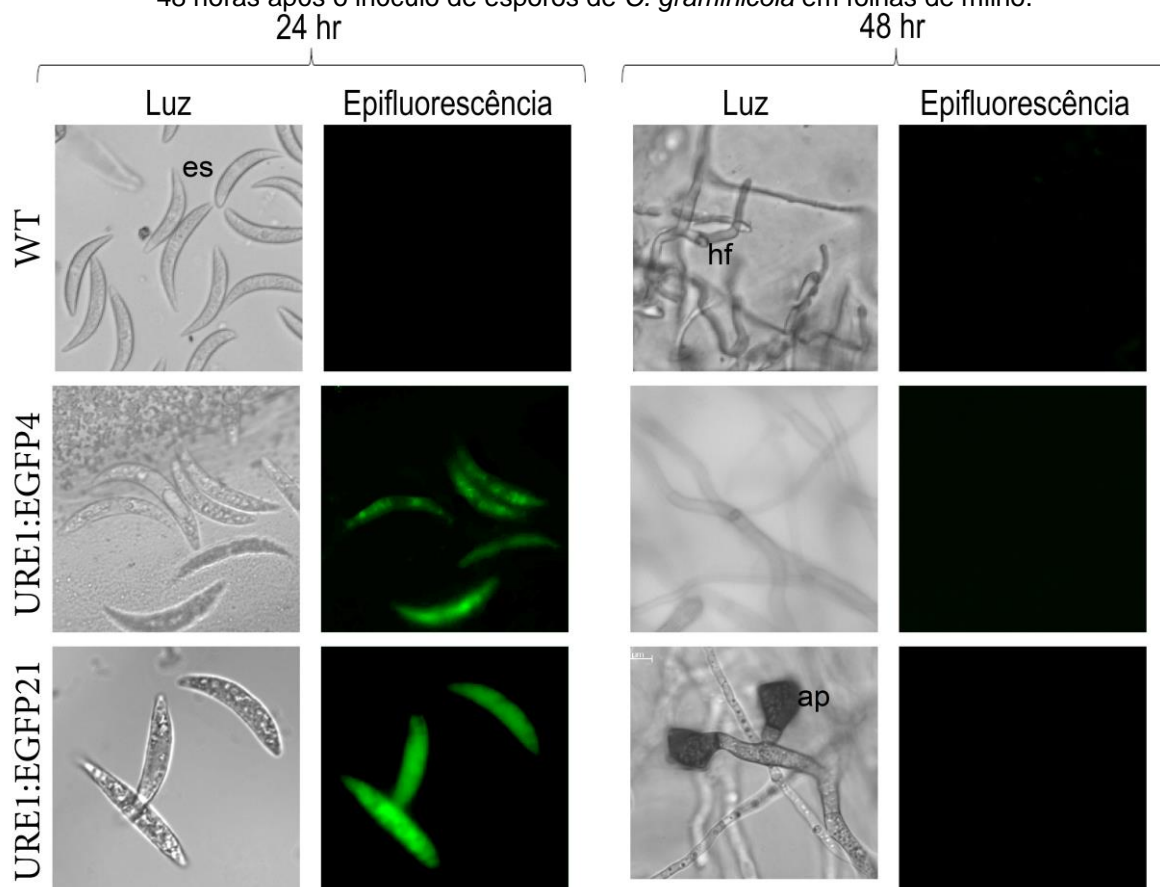
NOTA: ap: apressório; es: esporo; es*: esporo germinado.
Fonte: o autor.

Figura 19 - Microscopia de epifluorescência (b, d e f) e de campo claro (a, c e e) de esporos e hifas do mutante *ALA1:eGFP8* de *C. graminicola*, 24 horas (e e f) e 72 horas (a, b, c e d) após inoculação em folha de milho, apresentando fluorescência em esporos não germinados no citoplasma de forma pontilhada fina e grossa.



NOTA: es: esporo; es*, esporo germinado; tb: túbulo germinativo.
Fonte: o autor.

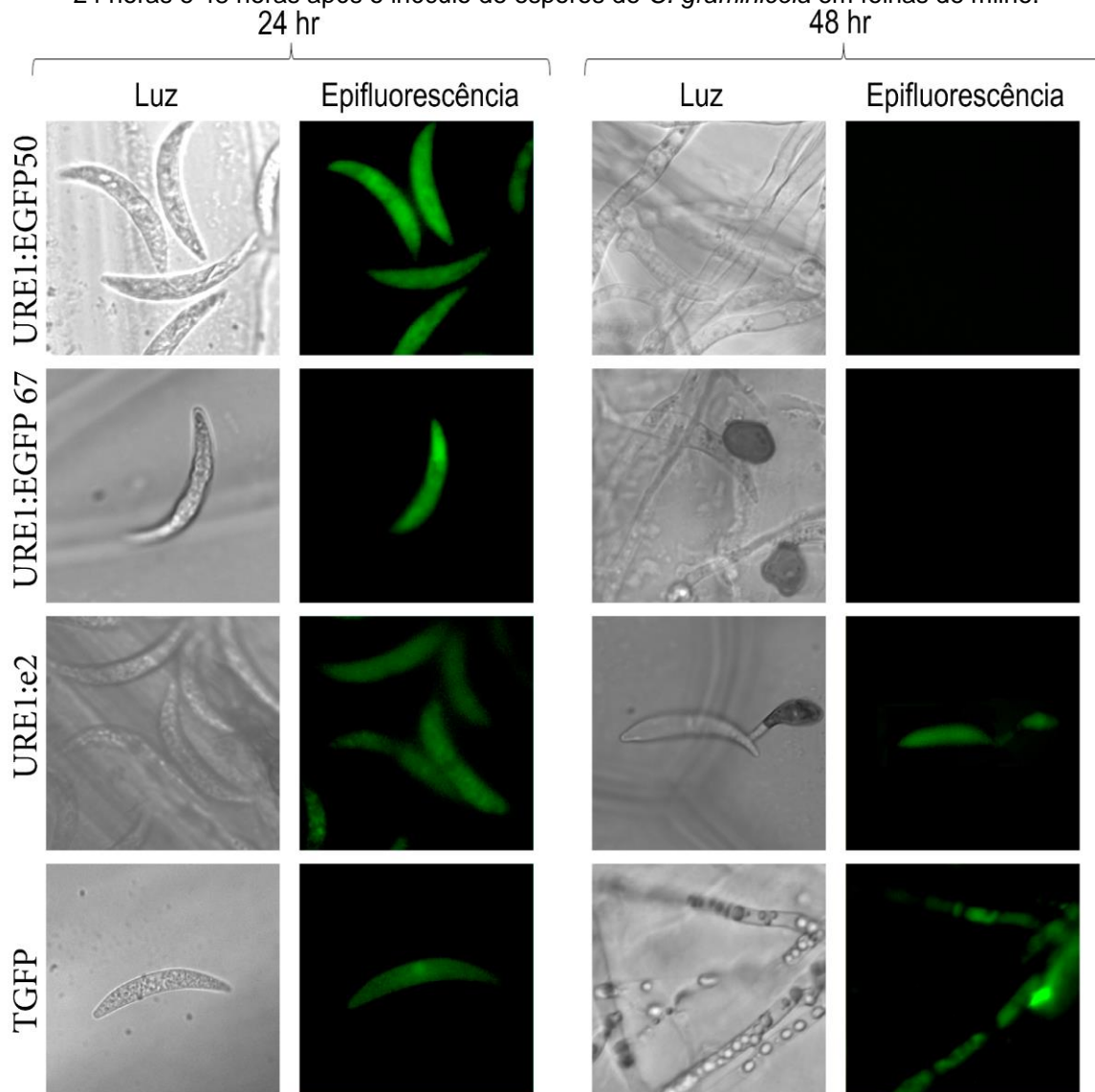
Figura 20 – Fotomicrografias da linhagem selvagem (WT), dos mutantes *URE1:eGFP 4, 21, 50 e 67*, um mutante ectópico *URE1e2* e um mutante com expressão constitutiva do *GFP (TGFP)*, 24 horas e 48 horas após o inóculo de esporos de *C. graminicola* em folhas de milho.



NOTA: WT: linhagem *C. graminicola* M01; ap: apressório; es: esporo; es*: esporo germinado; hf: hifas. Continua na próxima página.

Fonte: o autor.

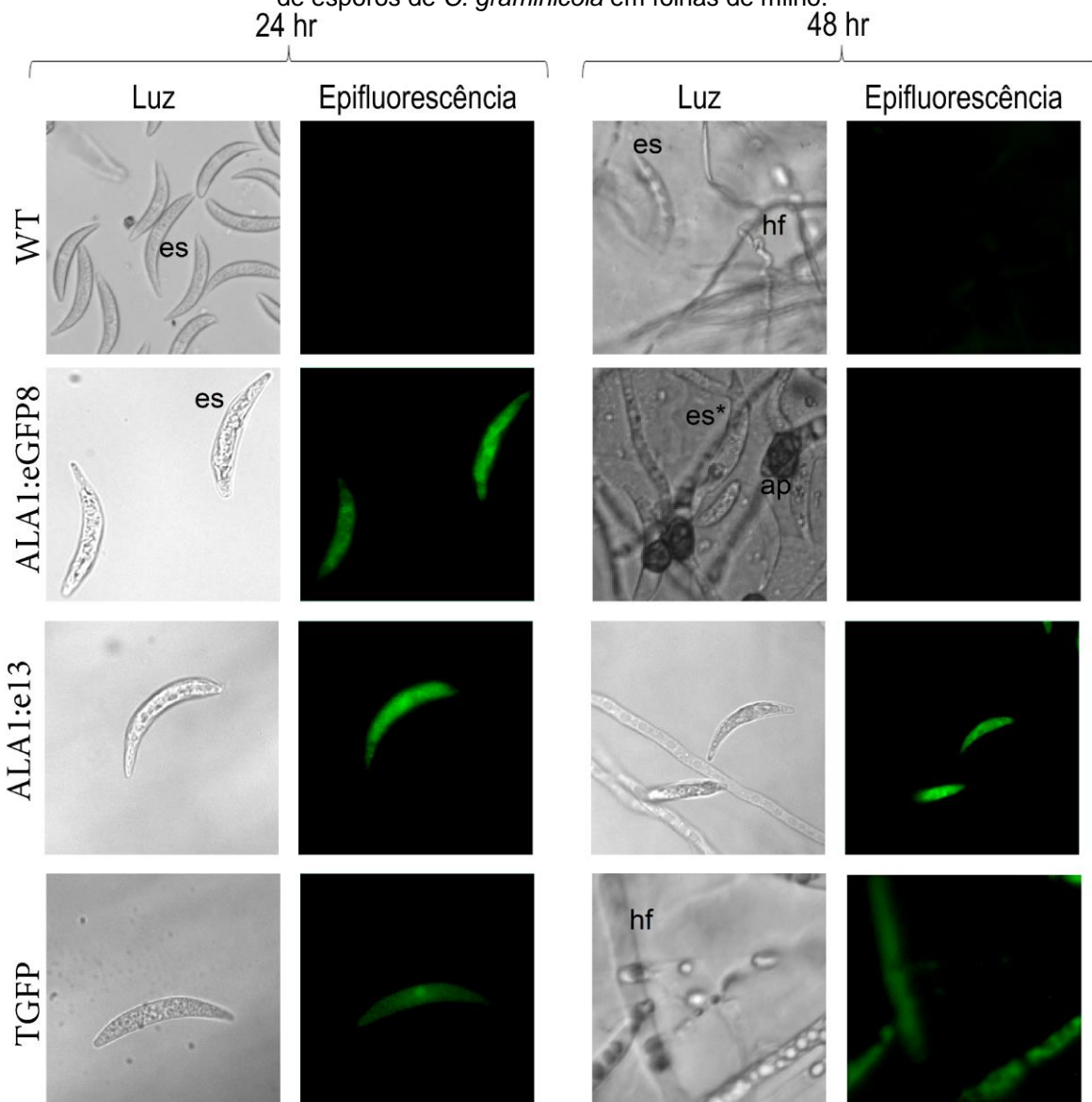
Figura 20 – Continuação. Fotomicrografias da linhagem selvagem (WT), dos mutantes *URE1:eGFP4*, 21, 50 e 67, um mutante ectópico *URE1e2* e um mutante com expressão constitutiva do *GFP* (*TGFP*), 24 horas e 48 horas após o inóculo de esporos de *C. graminicola* em folhas de milho.



NOTA: WT: linhagem *C. graminicola* M01; ap: apressório; es: esporo; es*: esporo germinado; hf: hifas.

Fonte: o autor.

Figura 21 – Fotomicrografias do mutante *ALA1:eGFP8*, linhagem selvagem (WT). Mutante ectópico *ALA1:e13* e um mutante com expressão constitutiva do eGFP (TGFP), 24 horas e 48 após o inóculo de esporos de *C. graminicola* em folhas de milho.

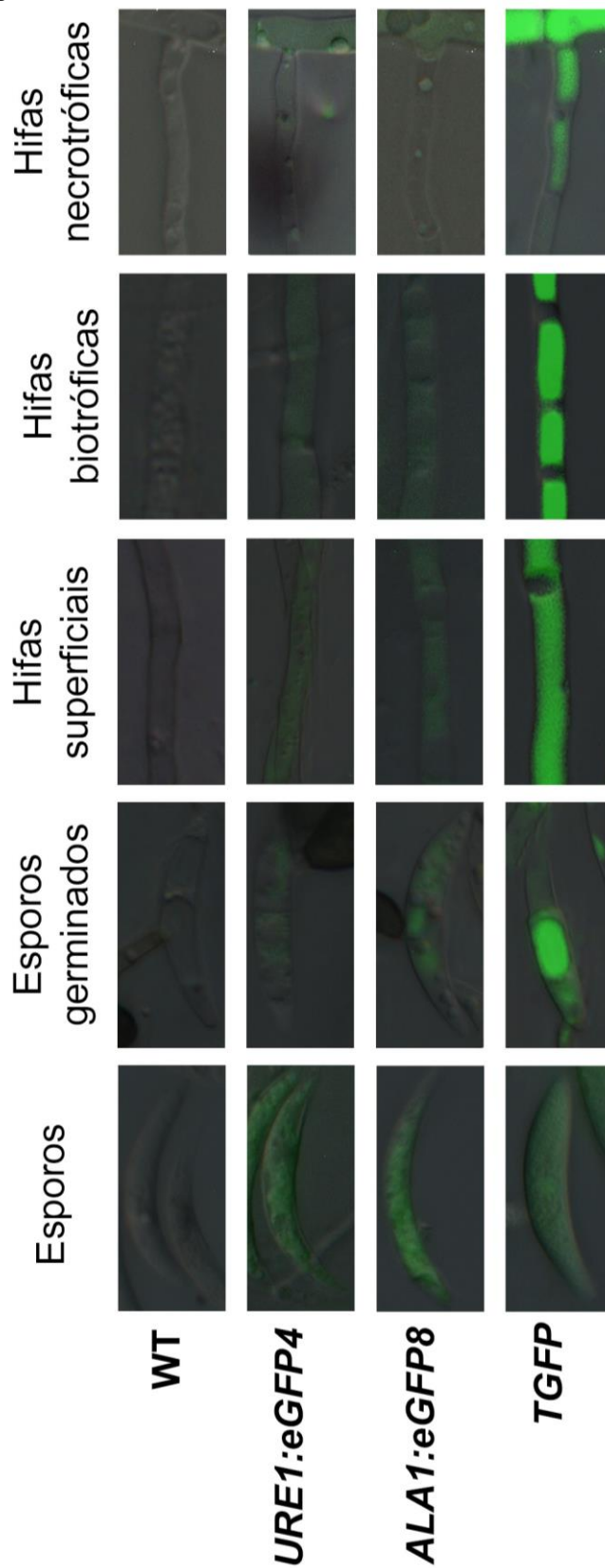


NOTA: WT: Linhagem *C. graminicola* M01; ap, apressório; es, esporo; es*, esporo germinado; hf, hifa primária.

Os mutantes *URE1:eGFP4*, *ALA1:eGFP8* e o *TGFP*, assim como a linhagem selvagem de *C. graminicola* M01 foram selecionados para inoculação em epiderme de catáfilo de cebola. Os mutantes apresentaram uma forte fluorescência em esporos não germinados. Já em tubos germinativos, hifas de penetração e hifas superficiais apresentaram fluorescência fortemente reduzida. Esses mutantes também não apresentaram fluorescência em hifas necrotróficas. Já o mutante *TGFP* apresentou uma forte fluorescência em todas as fases analisadas (Figura 22). A

fluorescência em esporos dos mutantes fusionados *URE1:eGFP4* e *ALA1:eGFP8* pode ser observada no citoplasma de forma pontilhada fina e grossa de forma heterogênea, enquanto a fluorescência observada no mutante *TGFP* é homoganeamente distribuída no citoplasma (Figura 22).

Figura 22 – Fotomicrografias compostas de campo claro DIC e epifluorescência FITC dos mutantes *URE1:eGFP4*, *ALA1:eGFP8*, *TGFP* e da linhagem selvagem de *C. graminicola* M01 de esporos, esporos germinados, hifas superficiais, hifas biotróficas e hifas necrotróficas.



Fonte: o autor.

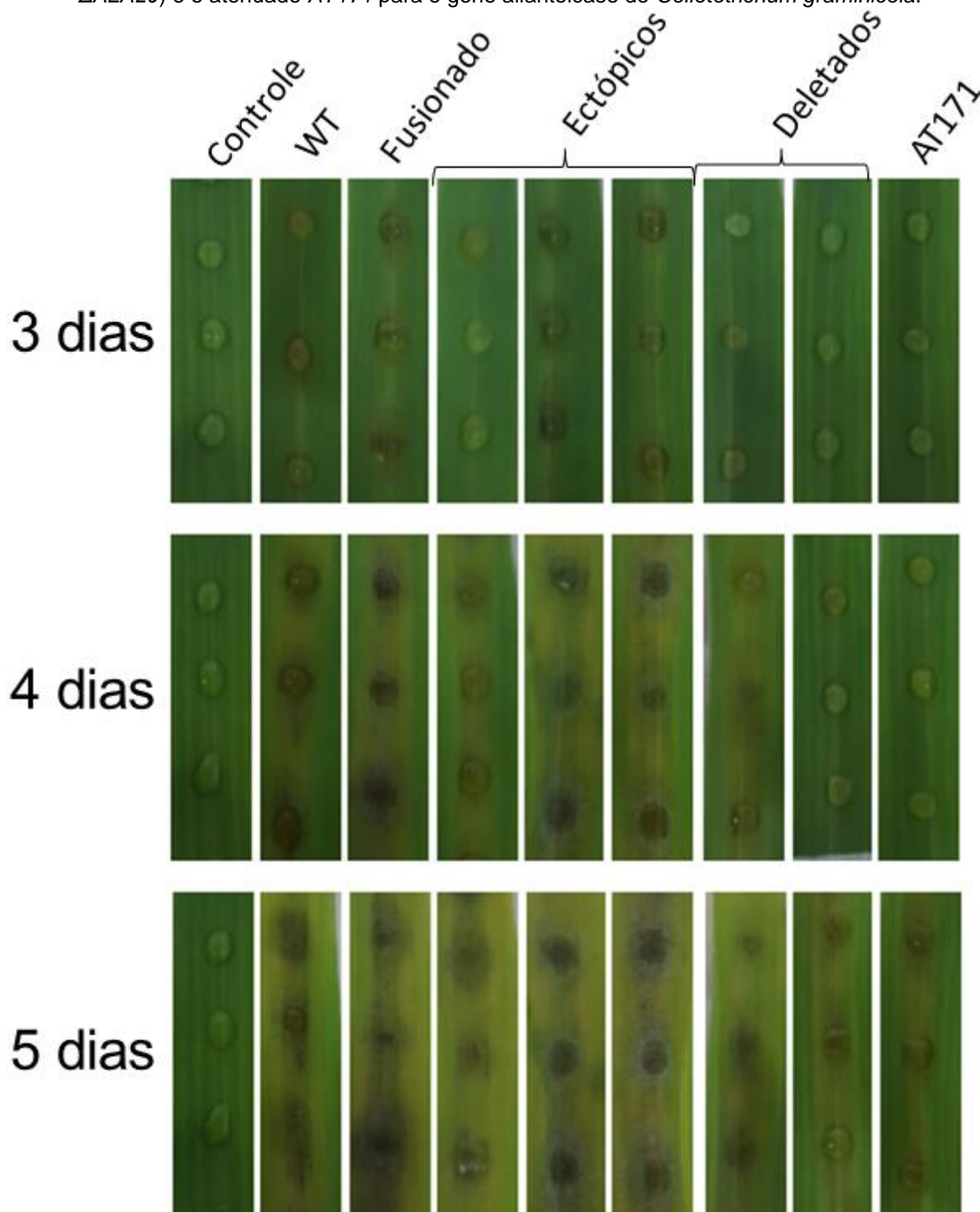
5.5 INDUÇÃO DE SINTOMAS EM FOLHAS DE MILHO DESTACADAS

Para esta análise foram utilizados os mutantes fusionados e ectópicos de ambas as enzimas (*URE1:eGFP4*, *URE1:eGFP21*, *URE1:eGFP50*, *URE1:eGFP67*, *URE1e2*, *URE1e3*, *URE1e16*, *ALA1:eGFP8*, *ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16*), além da linhagem selvagem (WT), quatro mutantes deletados para ambas as enzimas (Δ *URE24*, Δ *URE59*, Δ *ALA12* e Δ *ALA29*) cedidos por Glienke e colaboradores (2015), e o mutante *AT171* que apresenta redução na expressão do gene allantoicase (MÜNCHEN et al, 2011).

O mutante fusionado *ALA1:eGFP8*, bem como os ectópicos *ALA1e*, apresentaram desenvolvimento de sintomas semelhantes à linhagem selvagem, enquanto os mutantes deletados e o *AT171* apresentaram desenvolvimento de sintomas reduzidos até o quinto dia (Figura 23) após inoculação em folhas de milho. A partir do quinto dia todos os mutantes deletados desenvolveram sintomas semelhantes à linhagem selvagem. Esses resultados sugerem que a enzima allantoicase manteve atividade mesmo após fusão com a proteína eGFP.

Entretanto, os mutantes fusionados *URE1:eGFP* não induziram o desenvolvimento de sintomas até o terceiro dia, sendo semelhante aos observado para os mutantes deletados. O mutante *URE1:eGFP4* produziu sintomas semelhantes à linhagem selvagem a partir do quarto dia, e os demais mutantes fusionados induziram sintomas somente após o quinto dia, semelhante aos produzidos pelos mutantes deletados (Figura 23). A fim de verificar se a redução no desenvolvimento de sintomas pelos mutantes fusionados pode ser devido à redução da atividade da enzima urease em função da fusão *URE1:eGFP*, o experimento foi repetido com os mutantes *URE1:eGFP4* e *URE1:eGFP50* e a linhagem selvagem, adicionando-se sulfato de amônio (10mM) à suspensão de esporos antes da inoculação. Como pode ser observado na Figura 25, a suplementação com sulfato de amônio restaurou a capacidade de desenvolvimento de sintomas dos mutantes *URE1:eGFP4* e *URE1:eGFP50*.

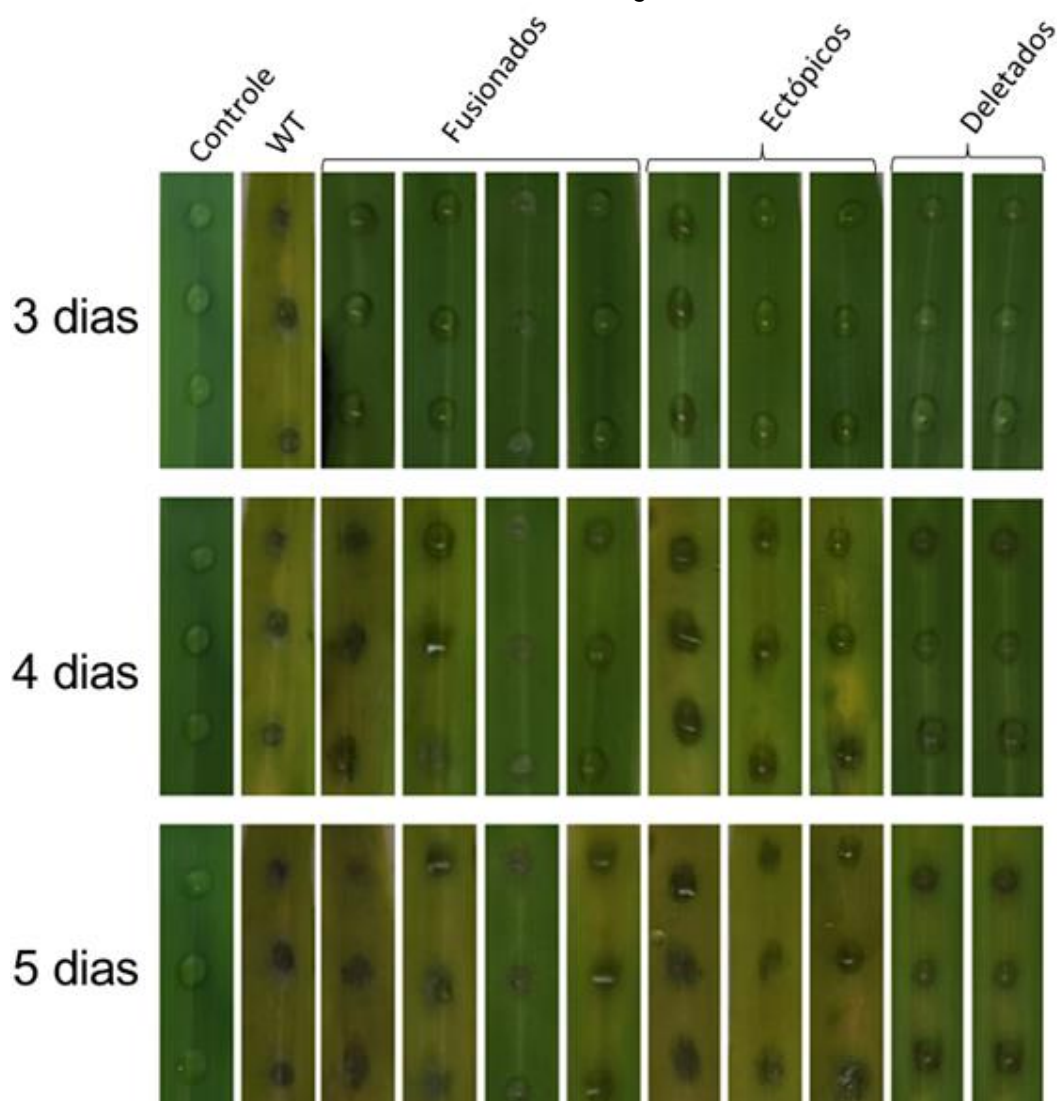
Figura 23 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT), mutante fusionado (*ALA1:eGFP8*), ectópicos (*ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16*) deletados (Δ *ALA12* e Δ *ALA29*) e o atenuado *AT171* para o gene allantoicase de *Colletotrichum graminicola*.



Nota: Controle: (Tween 20 0,01 %, sem esporos).

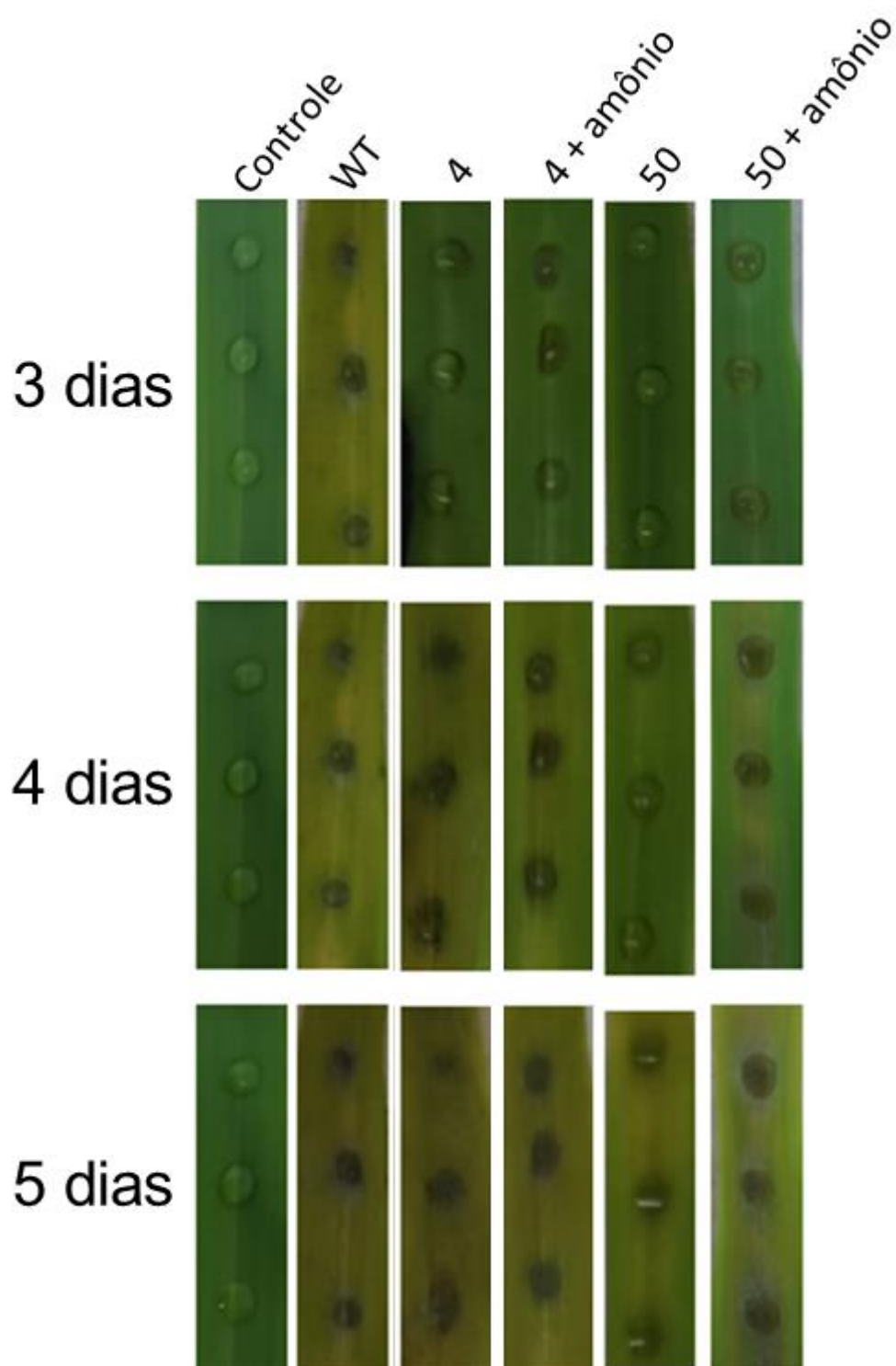
Fonte: o autor.

Figura 24 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT), mutantes fusionados (*URE1:eGFP4*, *URE1:eGFP21*, *URE1:eGFP50* e *URE1:eGFP67*), ectópicos (*URE1e2*, *URE1e3* e *URE1e9*) e deletados (Δ *URE24* e Δ *URE59*) para o gene urease de *Colletotrichum graminicola*.



Nota: Controle: (Tween 20 0,01 %, sem esporos).
Fonte: o autor.

Figura 25 – Indução de sintomas em folhas de milho destacadas pela linhagem selvagem (WT) e os mutantes fusionados *URE1:eGFP4* e *URE1:eGFP50* para o gene urease de *Colletotrichum graminicola*, com e sem adição de sulfato de amônio (10mM).



Nota: Controle: (Tween 20 0,01 %, sem esporos).

Fonte: o autor.

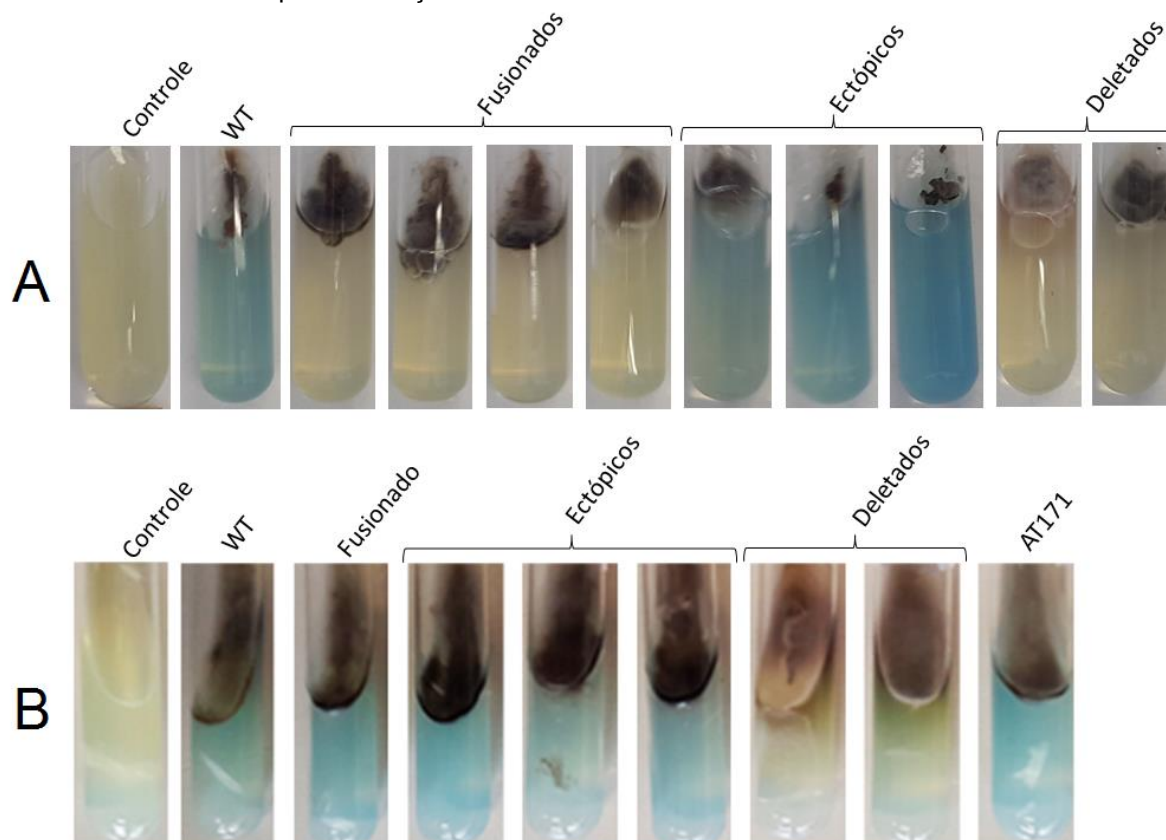
5.6 ANÁLISE FUNCIONAL DAS ENZIMAS ALLANTOICASE E UREASE FUSIONADAS COM O GENE *eGFP*

5.6.1 Utilização de fontes de nitrogênio

No teste para avaliar a atividade da enzima urease via indicador de pH, todos os mutantes ectópicos testados alteraram o pH do meio, sugerindo que a enzima urease produzida por essas linhagens manteve sua atividade semelhante à linhagem selvagem (Figura 26A). Por outro lado, todos os mutantes fusionados e deletados testados, apesar de apresentarem crescimento micelial, não alteraram a coloração do meio de cultura indicando que a ureia presente no meio não foi degradada em amônio (Figura 16A).

Por outro lado, no teste para avaliar a atividade da enzima allantoicase, ocorreu alteração de coloração do meio de cultura tanto para o mutante fusionado *ALA1:eGFP8* quanto para os ectópicos, indicando que a alantoína presente no meio foi degradada em amônio, e portanto, a enzima allantoicase produzida por essas linhagens manteve sua atividade semelhante à linhagem selvagem (Figura 26B). Também houve alteração da cor do meio para azul no teste realizado com o mutante *AT171*. Para os mutantes em que o gene responsável pela produção de allantoicase foi deletado (*ΔALA12* e *ΔALA29*), utilizados como controle, não foi verificada alteração de coloração do meio de cultura, indicando a não produção de amônio.

Figura 26 – Teste de atividade das enzimas urease e allantoicase via alteração de pH. (A) Crescimento micelial da linhagem selvagem (WT), mutantes fusionados (*URE1:eGFP4*, *URE1:eGFP21*, *URE1:eGFP50* e *URE1:eGFP67*), ectópicos (*URE1e2*, *URE1e3* e *URE1e9*) e deletados (Δ *URE24* e Δ *URE59*) para o gene urease de *Colletotrichum graminicola*, 05 dias após inoculação em meio ureia com Azul de Bromotimol. (B) Crescimento micelial da linhagem selvagem (WT), mutante fusionado (*ALA1:eGFP8*), ectópicos (*ALA1e13*, *ALA1e15* e *ALA1e16*) deletados (Δ *ALA12* e Δ *ALA29*) e o atenuado *AT171* para o gene allantoicase de *Colletotrichum graminicola*, 05 dias após inoculação em meio alantoína com Azul de Bromotimol.



NOTA: Azul indica o pH alcalino, amarelo-esverdeado indica o pH próximo de neutro. Controle: sem inoculação; WT: linhagem selvagem de *Colletotrichum graminicola* M01.

Fonte: o autor.

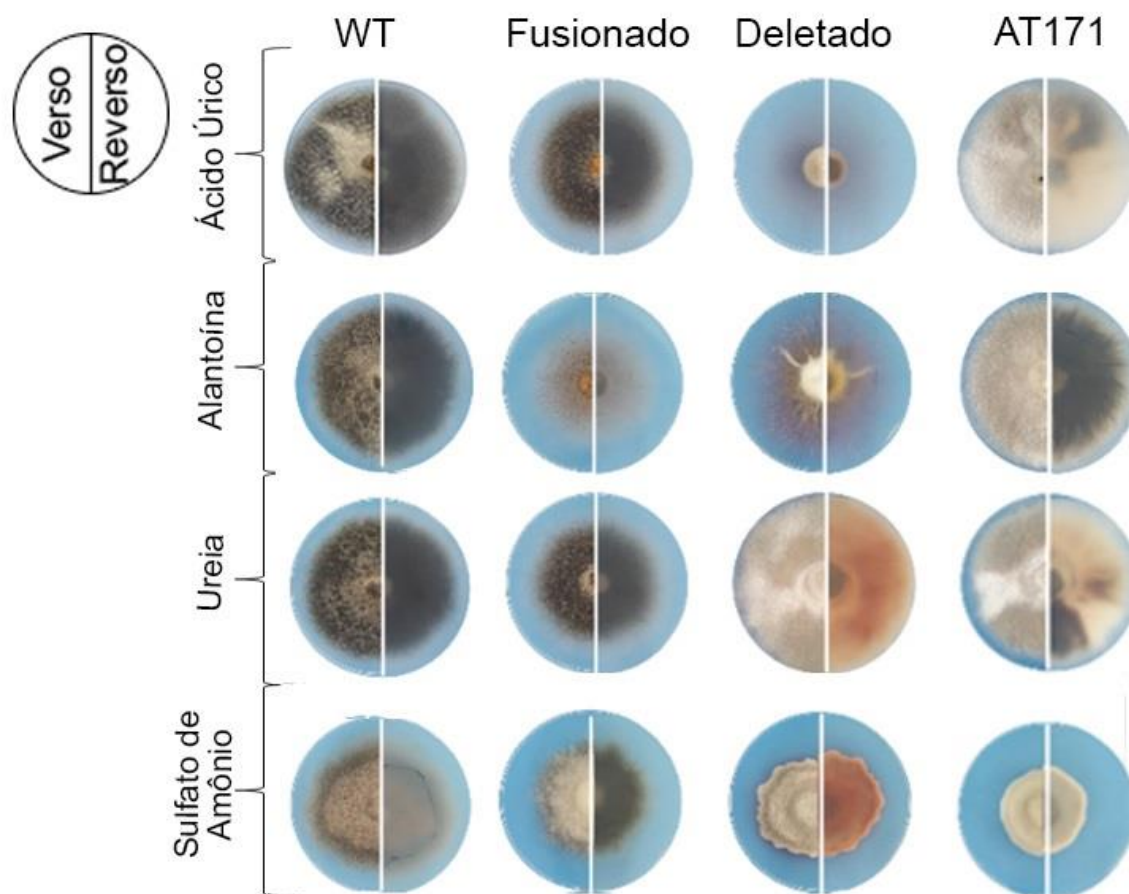
A avaliação da atividade das enzimas urease e allantoicase via crescimento micelial foi realizada por meio do inóculo dos mutantes em meio semissólido com restrição de nitrogênio. Assim como ocorreu no primeiro teste, houve diferença de resposta entre os mutantes fusionados de allantoicase e os mutantes fusionados de urease.

Conforme pode ser observado na Figura 26B, o mutante *ALA1:eGFP8* apresentou crescimento micelial semelhante ao crescimento da linhagem selvagem em todos os meios utilizados. Os mutantes deletados apresentaram crescimento diferente das linhagens selvagem e fusionada nos meios YNB com suplementação

de ácido úrico e alantoina, sendo possível observar uma menor densidade de hifas no meio, e aumento de hifas aéreas. O mutante *AT171* também apresentou excesso de hifas aéreas nos meios YNB suplementados com ácido úrico e alantoina. Em YNB suplementado com ureia os mutantes deletados apresentaram um crescimento em roseta ondulada e mudança de coloração e o *AT171* apresentaram setorização em seu crescimento e mudança de coloração. Todos os mutantes (fusionado, deletados e *AT171*) apresentaram alteração na morfologia, em relação ao selvagem, no meio YNB com suplementação de sulfato de amônio (Figura 27).

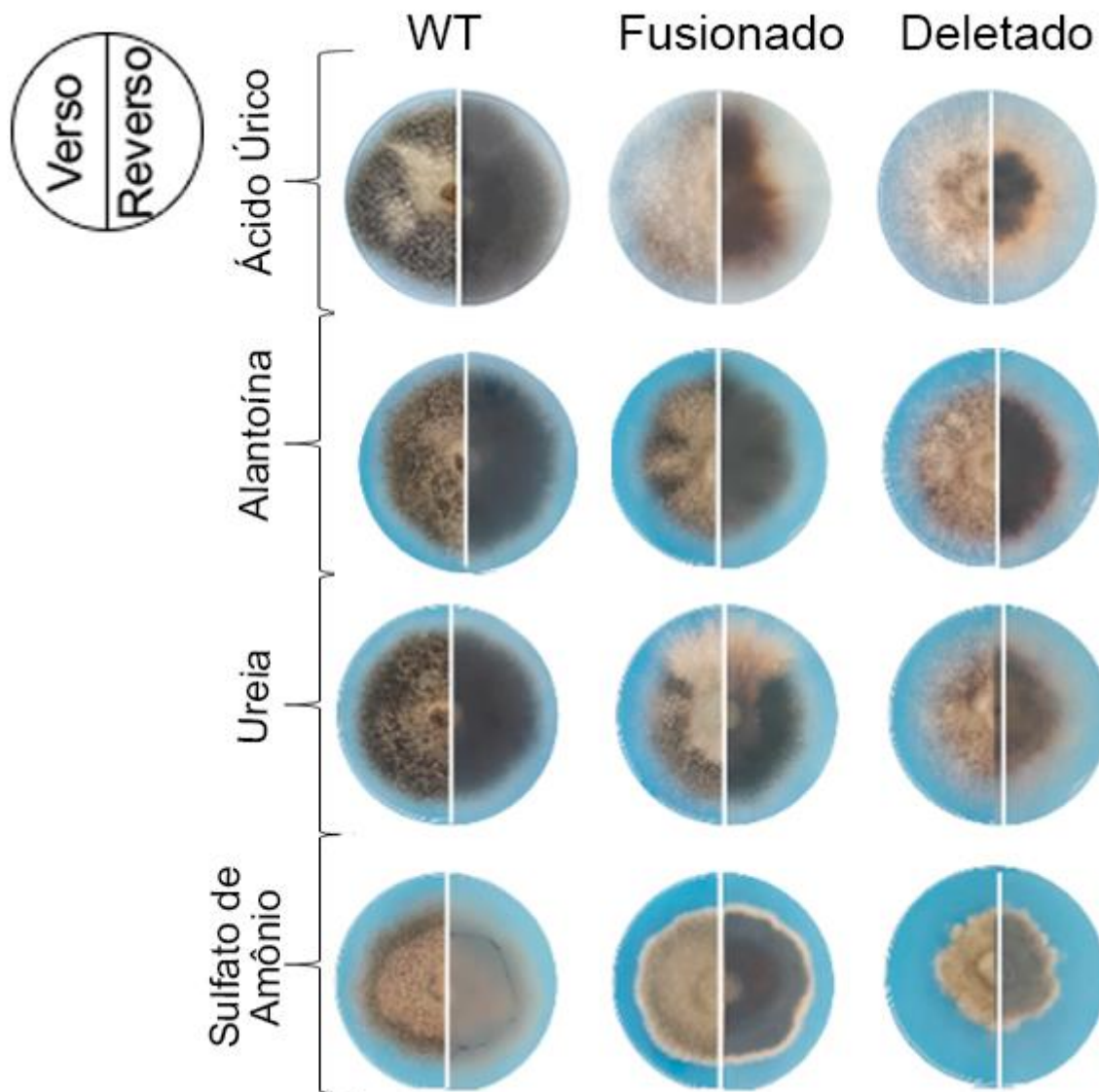
Por outro lado, como pode ser observado na Figura 28, tanto os mutantes deletados, quanto os fusionados para o gene urease apresentaram crescimento diferente quando comparados à linhagem selvagem nos meios com suplementação de ácido úrico, alantoina e ureia, sendo possível observar setorização e aumento de hifas aéreas. Já no meio YNB com suplementação de sulfato de amônio pode se observar crescimento mais lento das linhagens $\Delta URE1$ em relação às linhagens selvagem e fusionadas.

Figura 27 – Crescimento micelial (verso e reverso da colônia) da linhagem selvagem (WT), e dos mutantes *ALA1:eGFP8* (fusionado), Δ *ALA12* (deletado) e *AT171* (atenuado) em meio de cultura YNB suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio).



Fonte: o autor.

Figura 28 – Crescimento micelial (verso e reverso da colônia) da linhagem selvagem (WT), e dos mutantes *URE1:eGFP21* (fusionado) e $\Delta URE1$ (deletado) em meio de cultura YNB suplementado com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio). Avaliação de crescimento das linhagens selvagem, em meios com diferentes fontes de nitrogênio (ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio).



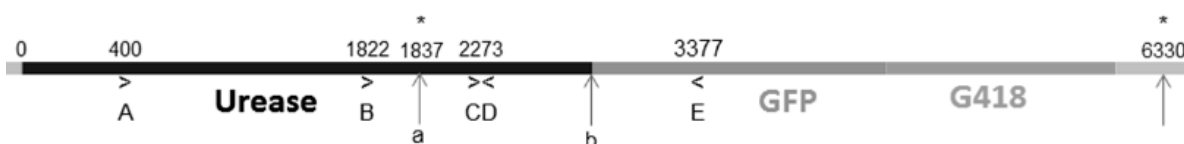
Fonte: o autor.

5.6.2 Sequenciamento do local de inserção de mutantes *URE1:eGFP*

A fim de verificar se a falta de atividade da enzima urease observada nos mutantes fusionados com *eGFP* é decorrente de mutação de quadro de leitura provocado por erros de inserção do cassete de fusão, foi realizado o sequenciamento do local esperado de inserção do cassete dos mutantes *URE1:eGFP4* e *URE1:eGFP50*. As sequências obtidas revelaram a inserção correta

do cassete via recombinação homóloga, não sendo detectada qualquer mutação e alteração do quadro de leitura da proteína urease, a não ser a fusão do gene *eGFP* (sem códon de início) no final do gene da urease (sem o códon de fim) (Figura 29).

Figura 29 – Esquema das sequências obtidas e localização de inserção do cassete de fusão *URE:eGFP* ocorrida por recombinação homóloga em mutantes *URE1:eGFP*.



Nota: A, *primer* CgramProbeUreF; B, *primer* CgUProbeNF; C, *primer* CgUPNF; D, *primer* CgUProbeNR; E, *primer* GFP (Tabela 2); a, ponto de fusão inicial do cassete; b, ponto de fusão interno do cassete *URE:eGFP*; *, localização dos *primers* nested.

Fonte: o autor.

5.6.3 Análise *in silico* das enzimas da via de degradação do ácido úrico

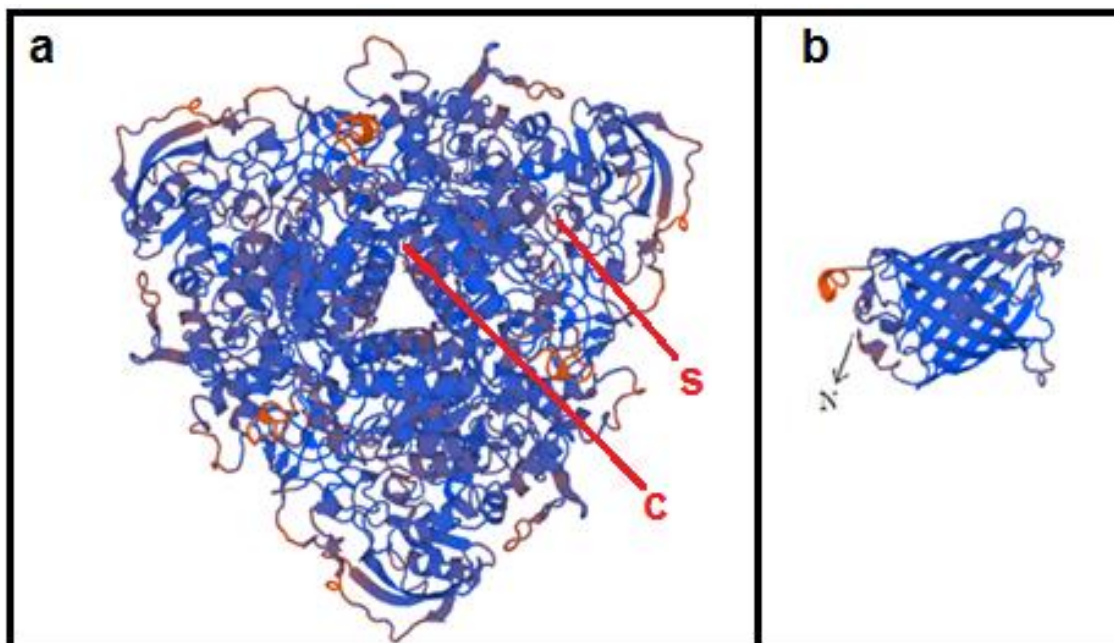
Mesmo em condições de baixa estringência (*e-value* = 1) não foi encontrada sequência similar à do gene responsável pela produção de alantoato deiminase de *Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata* no genoma de *Colletotrichum graminicola*, indicando que o fungo não possui a via alternativa de degradação de alantoato em ureia sem a utilização da enzima allantoicase.

Ainda, a fim de explicar a falta de atividade da enzima urease nos mutantes fusionados *URE1:eGFP*, foi realizada análise *in silico* de ambas as enzimas (urease e allantoicase) de *Colletotrichum graminicola*. Verificou-se que a enzima urease de *C. graminicola* é composta por 835 aminoácidos e tem uma massa de 89.547 Da. O seu sítio ativo é uma histidina localizada no aminoácido 590 e contém seis sítios de ligação a níquel – nos aminoácidos 404, 406, 487, 516, 542 e 630.

Realizou-se predição das proteínas a partir dos aminoácidos do gene da urease fusionada com o *eGFP* (sem o aminoácido metionina de início e sem a região terminadora). Dois modelos de proteínas do banco de dados foram gerados com base em similaridade pela ferramenta online *Swiss Model Workspace* (BIASINI et al, 2014; KIEFER et al, 2009; BORDOLI et al, 2006), sendo um para sequência referente à urease da planta *Canavalia ensiformis* (Figura 30a) e outro para a

sequência referente ao eGFP caracterizado por Barondeau e colaboradores (2007) (Figura 30b).

Figura 30 – Estrutura das proteínas urease e GFP. a) Estrutura da urease de *Canavalia ensiformis* (Swiss Model: 4gy7.1.A); b) Estrutura da proteína eGFP caracterizado por Barondeau e colaboradores (2007).



Nota: c, extremidade C-terminal; s, sítio ativo; N, extremidade N-terminal.

Fonte: Swiss Model Workspace (BIASINI et al, 2014; KIEFER et al, 2009; BORDOLI et al, 2006).

O primeiro modelo (Swiss Model: 4gy7.1.A) é referente à urease produzida por *Canavalia ensiformis*, uma planta tropical conhecida como feijão-de-porco. A urease de *C. ensiformis* possui o aminoácido C-terminal localizado dentro da estrutura quaternária da proteína. Como pode ser observado na Tabela 4, a urease produzida por *C. graminicola* possui identidade de sequência de 59,78 % com a urease de *C. ensiformis*. Isso significa que quando alinhadas as sequências, a maioria dos aminoácidos são idênticos. As proteínas destes dois organismos apresentaram similaridade de 47 %, referente a semelhanças físico-químicas. A cobertura entre as proteínas é de 77 %, quando comparada uma proteína fusionada e outra não. Quando é utilizada somente a urease para essa comparação, a cobertura aumenta para 99 % e a identidade de sequência para 59,54 %.

Tabela 4 – Comparação entre proteínas ureases produzidas por *C. graminicola* e *C. ensiformis*.

UREASE	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>
Tamanho (aminoácidos)	835	840
Sítio Ativo	Aminoácido 590	Aminoácido 593
Sítios de ligação à Níquel	6 sítios	7 sítios
Identidade de Sequência		59,54 %
Similaridade de Sequência		47 %
Cobertura		99 %

Fonte: o autor.

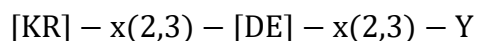
Quanto ao alinhamento entre sequências de aminoácidos dos fungos (*Diaporthe ampelina*, *Magnaporthe oryzae*, *Podospora anserina*, *Stachybotrys chlorohalonata*, *Ceratocystis fimbriata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Verticillium dahliae*, *Ophiostoma piceae* e *Eutypa lata*), das plantas (*Canavalia ensiformis* e *Cajanus cajan*), das bactérias (*Klebsiella aerogenes* e *Helicobacter pylori*) e da levedura (*Pseudozyma antarctica*) apresentam 9 aminoácidos próximos ao sítio ativo de forma conservada (Figura 31).

Figura 31 – Região do alinhamento para o sítio ativo (s), sítio de fosforilação de Tirosina-quinase e região C-terminal da sequência de aminoácidos de ureases de diferentes organismos.

Name	D	E	H	L	S	↓	K	***	D	***	Y	R	***	E	***	Y	V	V	E	A	D	G	V	V	C	E	A	A	P	A	E	T	L	P	L	T	Q	A	F	Y	V	Y								
1. <i>Colletotrichum graminicola</i>																																																		
2. <i>Canavalia ensiformis</i>																																																		
3. <i>Disporthe ampelina</i>																																																		
4. <i>Magnaporthe oryzae</i>																																																		
5. <i>Podospora anserina</i>																																																		
6. <i>Stachybotrys chlorohalonata</i>																																																		
7. <i>Ceratocystis fimbriata</i>																																																		
8. <i>Botryotinia fuckeliana</i>																																																		
9. <i>Verticillium dahliae</i>																																																		
10. <i>Ophiostoma piceae</i>																																																		
11. <i>Eutypa lata</i>																																																		
12. <i>Cajanus cajan</i>																																																		
13. <i>Klebsiella aerogenes</i>																																																		
14. <i>Pseudozyma antarctica</i>																																																		
15. <i>Helicobacter pylori</i>	A	

NOTA: s: sítio ativo; *: aminoácidos conservados; K: aminoácido lisina; R: aminoácido arginina; ***: dois ou três aminoácidos quaisquer; D: aminoácido ácido aspártico; E: aminoácido ácido glutâmico; Y: aminoácido tirosina; #: aminoácido C-terminal.

Utilizando a ferramenta online *MyHits* (PAGNI et al, 2004) foi predito um sítio de fosforilação de tirosina-quinase próximo à região C-terminal. Esse sítio tem como característica possuir uma sequência de aminoácidos específica:



Sendo KR, aminoácido lisina ou arginina; x(2,3), 2 ou 3 aminoácidos quaisquer; DE, aminoácido ácido aspártico ou ácido glutâmico; Y, tirosina, conforme observado na Figura 31.

Oito dos dez fungos filamentosos selecionados para este alinhamento apresentam essa sequência próxima à região C-terminal semelhante à urease de *C. graminicola* (Figura 31). Enquanto dois fungos filamentosos – *Ophiostoma piceae* e *Eutypa lata* –, ambas as plantas, a levedura e todas as bactérias não apresentaram essa sequência conservada. A identidade e a similaridade das sequências de aminoácidos dessas proteínas podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação de similaridade entre as proteínas ureases de diferentes microrganismos com *C. graminicola*.

		Identidade	Posições idênticas	Posições similares	Distância por emparelhamento
Fungos	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	80,36%	671	104	15,90%
	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	41,45%	618	145	20,20%
	<i>Diaporthe ampelina</i>	83,37%	697	93	12,90%
	<i>Eutypa lata</i>	81,13%	692	93	13,50%
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	78,68%	657	115	19,60%
	<i>Ophiostoma piceae</i>	79,88%	671	111	17,20%
	<i>Podospora anserina</i>	78,27%	659	109	18,10%
	<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	83,95%	701	104	13,10%
	<i>Verticillium dahliae</i>	85,41%	714	85	11,50%
Plantas	<i>Cajanus cajan</i>	59,12%	499	197	38,10%
	<i>Canavalia ensiformis</i>	58,70%	496	204	36,30%
Bactérias	<i>Helicobacter pylori</i>	40,01%	336	138	40,50%
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	58,23%	492	188	37,00%
Levedura	<i>Pseudozyma antarctica</i>	58,43%	499	205	35,40%

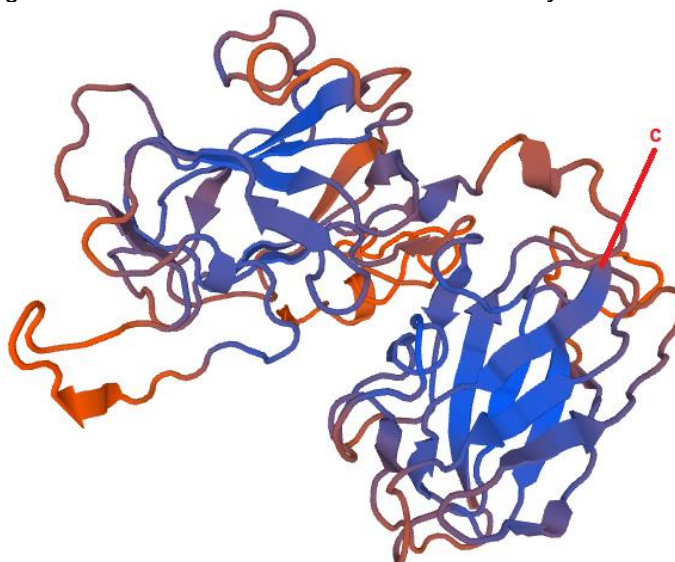
Fonte: o autor.

A enzima allantoicase de *C. graminicola* é composta por 354 aminoácidos e tem uma massa de 38.886 Da. Não há uma predição do sítio ativo, porém essa proteína é caracterizada por dois domínios, que vão do aminoácido 39 ao 191 e do

213 ao 351, correspondendo a 82,5 % da proteína. O mesmo ocorre em outros microrganismos, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt cod. de acesso: A6ZVU9).

Assim como a análise da proteína urease, para análise estrutural da allantoicase foi utilizada a ferramenta online *Swiss Model Workspace* (BIASINI et al, 2014; KIEFER et al, 2009; BORDOLI et al, 2006). Utilizando a sequência de aminoácidos da allantoicase fusionada com o *eGFP* (sem o aminoácido metionina de início e sem a região terminadora) foram gerados dois modelos de proteínas do banco de dados com base na sua similaridade, um para sequência referente à allantoicase (Figura 302) e outro para a sequência referente ao *eGFP* (Figura 30b). O primeiro modelo encontrado (*Swiss Model* cod. de acesso: 1sg3.1.A) foi a allantoicase produzida por *Saccharomyces cerevisiae*. Como pode ser observado na Tabela 6, a proteína produzida por *C. graminicola* possui identidade de sequência de 49,85 % e similaridade de 45 % com a produzida por *S. cerevisiae*. A cobertura entre as proteínas é de 77 %, na comparação entre uma proteína fusionada e outra natural. Quando utilizada para comparação a allantoicase sem fusão, essa cobertura é de 94 % e a identidade de sequência é 50,15 %.

Figura 302 - Estrutura da urease de *Saccharomyces cerevisiae*.



NOTA: c, extremidade C-terminal.

Fonte: *Swiss Model Workspace* (BIASINI et al, 2014; KIEFER et al, 2009; BORDOLI et al, 2006).

Tabela 6 - Comparação das enzimas allantoicases de *C. graminicola* e *Saccharomyces cerevisiae*.

ALLANTOICASE	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tamanho (aminoácidos)	354	343
Domínios	39-191; 213-351	31-182; 204-342
Identidade de Sequência		50,15%
Similaridade de Sequência		45 %
Cobertura		94 %

Fonte: o autor.

As sequências de aminoácidos dos fungos (*Magnaporthe oryzae*, *Podospora anserina*, *Stachybotrys chlorohalonata*, *Ceratocystis fimbriata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Verticillium dahliae*, *Ophiostoma piceae* e *Eutypa lata*), das leveduras (*Sacharomyces cerevisiae* e *Pseudozyma antarctica*) foram utilizadas para análise da proteína allantoicase.

A ferramenta online MyHits (PAGNI et al, 2004) prediz um sítio de amidação entre os aminoácidos 350 e 353, que se encontra próximo à região C-terminal. Esse sítio tem como característica possuir uma sequência de aminoácidos específica:



Sendo x, um aminoácido qualquer; G, aminoácido glicina; KR, aminoácido lisina ou arginina.

Seis dos oito fungos filamentosos selecionados para este alinhamento apresentam essa sequência próxima à região C-terminal igualmente à allantoicase de *C. graminicola*, enquanto outros três fungos filamentosos – *Podospora anserina*, *Ophiostoma piceae* e *Eutypa lata* – e as duas leveduras não apresentam essa sequência conservada como pode ser observado na Figura 313. A identidade e a similaridade das sequências de aminoácidos dessas proteínas pode ser observada na Tabela 7.

Figura 313 – Região do alinhamento da sequência de aminoácidos de allantoicases de diferentes organismos para o sítio de amidação.

Name	K	R	L	R	V	F	G	K	R	A	-	-
1. <i>Colletotrichum graminicola</i>
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	.	.	I	.	.	W	.	Y
3. <i>Magnaporthe oryzae</i>	.	.	V	R	.	.	T	.
4. <i>Podospora anserina</i>	.	.	V	.	.	.	A	.	.	.	V	.
5. <i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	A	Y	Q	.
6. <i>Ceratocystis fimbriata</i>	.	.	I	.	A	S	T	N
7. <i>Botryotinia fuckeliana</i>	.	.	I	.	.	L	.	.	.	S	V	.
8. <i>Verticillium dahliae</i>	.	.	V	.	.	Y
9. <i>Ophiostoma piceae</i>	.	.	I	.	.	Y	.	T	.	.	I	.
10. <i>Eutypa lata</i>	L	A	.	.	S	I	.
11. <i>Pseudozyma antarctica</i>

NOTA: *: um aminoácido qualquer; G: aminoácido glicina; K: aminoácido lisina; R: aminoácido arginina.

Tabela 7 – Comparação da allantoicase de diferentes microrganismos com *C. graminicola*.

		Identidade	Posições similares	Posições idênticas	Distância por emparelhamento
Fungos	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	75,21%	60	267	19,00%
	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	72,78%	56	270	94,70%
	<i>Eutypa lata</i>	78,31 %	56	278	16,70%
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	78,15%	49	279	46,00%
	<i>Ophiostoma piceae</i>	73,18%	60	262	21,70%
	<i>Podospora anserine</i>	72,96%	66	259	22,40%
	<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	79,33%	51	284	96,20%
Leveduras	<i>Verticillium dahlia</i>	79,10%	48	280	90,90%
	<i>Pseudozyma Antarctica</i>	32,97%	60	122	93,20%
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46,54%	101	168	92,00%

Fonte: o autor.

Pode-se verificar, através da ferramenta online SignalP (EMANUELSSON et al, 2007), a ausência de peptídeo sinal nas proteínas urease e allantoicase de *C. graminicola*, indicando que ambas as proteínas não são secretadas, ou seja, as estruturas destas enzimas são compatíveis com proteínas citoplasmáticas.

6 DISCUSSÃO

Estudos de genes associados à virulência e à patogenicidade vêm sendo amplamente realizados, a fim de identificar novos sítios para o controle dirigido de fitopatógenos (FIGUEIREDO et al, 2010; MÜNCH et al, 2011; GOULIN et al, 2016). O principal objetivo deste trabalho foi identificar a fase de infecção em que as enzimas urease e allantoicase são produzidas por *C. graminicola*. Para a manipulação genética e estudos de genes em fitopatógenos, como *C. graminicola*, uma transformação genética eficiente é uma ferramenta essencial. Neste trabalho foram obtidos e avaliados 88 transformantes com inserção dos cassetes relacionados aos genes urease (52 transformantes) e allantoicase (36 transformantes).

Tais mutantes foram avaliados por PCR, sendo classificados como fusionados (apresentaram bandas do tamanho esperado) ou ectópicos, tanto para a transformação referente à urease, quanto para allantoicase. Tais mutantes foram então avaliados por *Southern Blot*, sendo então selecionados os mutantes fusionados contendo apenas uma cópia do cassete inserido no genoma. Entretanto, o mutante *ALA1:eGFP8* apresentou uma banda de aproximadamente 4500 pb, enquanto era esperada uma banda de 2061 pb. Sugere-se que o corte previsto da enzima de restrição *Pst*I na base de número 3388 não tenha ocorrido, e então um fragmento de tamanho 4596 pb tenha sido obtido. A análise de *Southern Blot* utilizando outra enzima de restrição deverá ser realizada a fim de comprovar esta hipótese. Uma vez que as análises por PCR comprovam a localização correta do cassete no genoma deste mutante, e a análise por *Southern Blot* comprova a inserção única no genoma, este mutante foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Assim, foram selecionadas as linhagens contendo cópia única do respectivo cassete e pelo menos 3 ectópicos para cada gene, sendo quatro mutantes *URE1:eGFP* e um *ALA1:eGFP*. Estes foram avaliados quanto ao momento de expressão das proteínas por microscopia de fluorescência, sintomas em folhas de milho e atividade proteica (via alteração de pH e via crescimento em meio com restrição de nitrogênio).

Em todos os mutantes foi observada a germinação dos esporos e a produção de apressórios 24 horas após o inóculo. Estes dados estão de acordo com trabalhos anteriores, como os realizados por Khan e Hsiang (2003) e Politis e Wheeler (1973) que descrevem que os primeiros apressórios em *C. graminicola* surgem após 6 horas após inoculação em folhas destacadas de diversas espécies de plantas (inclusive espécies de milho) quando incubadas a 23 °C.

Os mutantes fusionados para ambos os genes apresentaram fluorescência fortemente reduzida nos estágios iniciais de infecção, ou seja, nas hifas de penetração e biotróficas. Nenhuma fluorescência foi observada em hifas necrotróficas do fungo. Pode-se perceber pela análise de microscopia que tanto a emissão de fluorescência referente à urease, quanto referente à allantoicase se tornam inferiores após a germinação dos esporos. Isso indica que as proteínas urease e allantoicase são produzidas nos esporos não germinados e logo após a germinação o que se observa nas imagens de fluorescência são os resíduos referentes às enzimas que estavam presente no citoplasma do esporo. Entretanto, estas enzimas deixam de ser produzidas em fase de formação de apressório. Uma vez que tais enzimas participam da mesma rota metabólica (degradação de ácido úrico) já era esperado que ambas fossem produzidas na mesma fase de infecção. Essa observação é condizente com os resultados obtidos por Münch et al (2011) e Glienke et al (2015), que sugeriram que tais enzimas são necessárias nas fases iniciais da infecção (antes de penetração do tecido vegetal) para a obtenção de nitrogênio na superfície da folha vegetal, ambiente pobre em nitrogênio assimilável (RUTHERFORD, 2014; XU et al, 2016). Após o desenvolvimento de hifas biotróficas e necrotróficas essas enzimas não são mais essenciais para absorção de nitrogênio e o fungo passa a utilizar as fontes disponíveis de nitrogênio no interior da célula vegetal como nitrito e nitrato (SCHLÜTER et al, 2012).

Pelas análises realizadas, as enzimas urease e allantoicase de *C. graminicola* não apresentam peptídeo sinal, indicando que são proteínas citoplasmáticas corroborando os dados obtidos por O'Connell e colaboradores (2012). Krejewska (2009) demonstrou que ureases de bactérias, plantas e fungos possuem alta homologia de sequência de aminoácidos e que ureases de plantas e fungos são constituídas por subunidades idênticas, ou seja, todas ureases são variantes evolutivas de uma mesma enzima ancestral. Este estudo também cita que todas as

ureases produzidas por plantas e bactérias, exceto de *Helicobacter pylori*, são citoplasmáticas, sendo improvável que a urease produzida por *C. graminicola* seja secretada. As imagens de fluorescência apresentadas neste trabalho confirmam essa hipótese, ou seja, as proteínas, urease e allantoicase de *C. graminicola* estão presentes principalmente no citoplasma dos esporos (antes da germinação e da formação de apressório), e não são associadas à parede celular ou secretadas.

Nos testes de inoculação em planta, foi observado que os transformantes *URE1:eGFP* apresentaram sintomas reduzidos em folhas destacadas de milho e nos testes de atividade via indicador de pH também não produziram amônia em meio de cultura. Entretanto, a hipótese de haver uma mudança na fase de leitura da proteína urease nos mutantes aqui obtidos foi descartada, uma vez que não foi encontrada diferença entre os mutantes *URE1:eGFP* sequenciados, quando comparadas com a sequência padrão do genoma de *C. graminicola* (GenBank cod. de acesso: NW_007361658.1) com o cassete inserido na região correta. Sugere-se assim que a falta ou redução de atividade da enzima urease nos mutantes fusionados com a proteína *eGFP* ocorra por alteração estrutural. Marriott e Parker (2003) relatam que por causa de sua estrutura o *GFP* pode influenciar forte ou fracamente na estrutura da proteína quando fusionado a ela. De fato, Azuma e colaboradores (2016) observaram que na fusão de cinco proteínas diferentes da bactéria *Aquifex aeolicus* com uma proteína *GFP* modificada, uma delas (retro-aldolase) apresentou diminuição da atividade, sendo cinco vezes menos eficiente que a proteína correspondente livre.

Observou-se pelas análises *in silico* da enzima urease de *C. graminicola*, que apesar de os sítios de ligação à níquel e o sítio ativo não se encontrarem próximos à extremidade C-terminal (local de fusão da proteína *eGFP*), um sítio de fosforilação de Tirosina-quinase existe nesta região, a menos de 30 aminoácidos da extremidade C-terminal. Isso poderia explicar a redução na atividade da proteína observada no presente trabalho, uma vez que esse sítio de fosforilação é descrito como um sítio de controle de interação proteína-molécula, proteína-proteína, de regulação e função adaptadora (SILVA et al, 2009). O mesmo não ocorre para o sítio de amidação predito para a enzima allantoicase, já que este não se localiza tão próximo da extremidade C-terminal e não está localizado no interior da estrutura quaternária da proteína, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que a

enzima allantoicase do mutante *ALA:eGFP8* apresentou atividade. Esse mutante também apresentou desenvolvimento de sintomas em folhas de milho semelhantes à linhagem selvagem *C. graminicola* M01. O mutante *AT171* também apresentou resultados positivos para o teste de avaliação de atividade via alteração de pH. Assim, sugere-se que apesar da inserção do T-DNA no promotor do gene responsável pela produção da enzima allantoicase, este continua a ser expresso, mesmo que em taxas reduzidas. Por sua vez, os mutantes deletados Δ *ALA1* e Δ *URE1* apresentaram sintomas reduzidos em relação aos mutantes fusionados e a linhagem selvagem.

Tal hipótese de redução ou perda de atividade da enzima urease também é reforçada pela restauração da virulência observada pelos mutantes *URE1:eGFP* quando inoculados em folhas de milho com suplementação de sulfato de amônio (forma de nitrogênio assimilável presente na via de degradação do ácido úrico).

Interessante observar que a não produção de amônia observada nos mutantes urease (pela redução de atividade da enzima urease) não foi compensada por outra via de degradação da ureia, apesar do genoma de *C. graminicola* apresentar duas sequências do gene responsável pela produção de ureia carboxilase (O'Connell et al, 2012). Assim, essa proteína não é produzida ou então não é ativada pelo fungo, já que não existe uma sequência de amilase não secretada adjacente à sequência do gene de ureia carboxilase. Sugere-se que, caso a proteína ureia carboxilase seja funcional em *C. graminicola*, sua produção não ocorra nos estágios iniciais do desenvolvimento, uma vez que durante os teste de atividade via alteração de pH, o substrato ureia presente no meio não foi degradado em até 7 dias após a inoculação.

Tanto a linhagem selvagem *C. graminicola* M01, quanto o mutante fusionado *ALA1:eGFP8* apresentaram crescimento lento e produção de hifas difusas quando cultivados em meio YNB suplementado com sulfato de amônio. O mesmo não ocorreu no cultivo em YNB suplementado com ácido úrico ou ureia. Essas alterações morfológicas podem ser decorrentes da citotoxicidade de íons de amônio, como já observado em plantas (BITTSÁNSZKY et al, 2015), fungos e bactérias (MOBLEY et al, 1995) e até em humanos (YUST et al, 1976). Entretanto, não é observado esse tipo de citotoxicidade pela produção de amônio pelos organismos em meios de cultura contendo ureia livre (MOBLEY et al, 1995).

O estudo de genes envolvidos na virulência e patogenicidade de *C. graminicola* é importante para um melhor entendimento da doença, e assim identificação de alvos para o controle da antracnose. As proteínas urease e allantoicase estão relacionadas à virulência, pois a deleção do gene responsável pela produção de urease ou de allantoicase (GLIENKE, 2015) e/ou a diminuição da atividade da proteína urease, demonstrada no presente trabalho, atrasam o desenvolvimento de sintomas da doença. Uma vez que a deleção de tais genes reduz, mas não elimina o desenvolvimento de sintomas, sugere-se que tais genes estejam relacionados à virulência e não à patogenicidade do fungo, confirmando a hipótese discutida por Glienke (2015). Outros fatores relacionados à patogenicidade e à virulência de *C. graminicola* são, por exemplo, o gene *Cgfl*, cuja deleção faz com que ocorra um atraso na formação de apressórios (SANZ-MARTÍN et al, 2016), a proteína β -1,3-glucana que é essencial para a esporulação assexuada e diferenciação de apressórios funcionais e o gene *GLS1*, que é indispensável para a penetração apressorial e desenvolvimento de hifas necrotróficas (Oliveira-Garcia e Deising, 2013). Os genes *GPI12*, *GAA1* e *GPI8* são necessários para a patogenicidade, influenciando também na diferenciação de apressórios funcionais (Oliveira-Garcia e Deising, 2016). E a deleção do gene *Str1*, que apesar de os mutantes apresentarem formação de apressórios funcionais, quando inoculados em folhas e em colmo de milho, esses mutantes apresentavam sintomas reduzidos (WANG et al, 2015).

Ainda, os resultados de microscopia observados no presente trabalho, corroboram a hipótese de que as enzimas urease e allantoicase participam das fases iniciais do processo de infecção e que tais enzimas são produzidas e utilizadas no citoplasma celular, não sendo secretadas ou aderidas a parede celular de *Colletotrichum graminicola*.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- As enzimas urease e allantoicase são produzidas no início do desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola* e participam das fases iniciais de infecção, na antracnose foliar do milho;
- As enzimas urease e allantoicase são produzidas e utilizadas no citoplasma celular, não sendo secretadas ou aderidas a parede celular de *Colletotrichum graminicola*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, p. 1268, 2008.
- ARMESTO, C. et al. Genetic transformation with the *gfp* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee with blister spot. **Brazilian Journal of Microbiology** p. 1222-1229, 2012.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics** v. 22, p. 195-201, 2006.
- AZUMA, Y. et al. Quantitative Packaging of Active Enzymes into a Protein Cage. **Nanoreactors**, 2016.
- BANCAL, M-O. et al. Modelling fungal sink competitiveness with grains for assimilates in wheat infected by a biotrophic pathogen. **Annals of Botany** v. 110 p. 113–123, 2012.
- BARONDEAU, D. P. et al. The case of the missing ring: radical cleavage of carbon-carbon bond and implications for GFP chromophore biosynthesis. **J. Am. Chem. Soc.** v. 129 p. 3118-3126, 2007.
- BERG, M. A. van den; MARUTHACHALAM, K. Genetic Transformation System in Fungi, v. 1. **Springer**, 2015.
- BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R. L. The biology corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Phytopathology** v. 83 p. 596-608, 1999.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information **Nucleic Acids Research**, v. 42 (W1): W252-W258, 2014.
- BITTSÁNSZKY, A et al. Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science**, n. 231, p. 184-190, 2015.
- BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modelling using SWISS-MODEL Workspace. **Nature Protocols**, 2009.
- BUNIVA; VAUQUELIN Extrait d'un mémoire des cit. Sur l'eau de l'amos de femme et de vache. **Ann. Chim**, v. 1, n. 33, p. 269, 1800.
- CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 71, p. 1190-1196, 1981.
- CARTER, E. L. et al. Interplay of metal ions and urease. **Metallomics** v. 1 n. 3 p. 207-221, 2009.

- CASELA, C. R. et al. de A. **Doenças na cultura do milho**. A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 216-256, 2008.
- CASPER, S. J.; HOLT, C. A. Expression of the green fluorescent protein encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. **Gene** v. 173 p. 69-73, 1996.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** v. 5148 p. 802–805, 1994.
- CHANG, S.; PIKAARD, C. S. Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. **J Biol Chem** v. 280 p. 796-804, 2005.
- CHIU, W. et al. Engineered *GFP* as a Vital Reporter in Plants. **Curr. Biol.** v. 3, p. 325-330, 1996.
- CODY, D. W. et al. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the *Aequorea* Green-Fluorescent Protein to Detect Expression of an Endopolygalacturonase Gene of *Colletotrichum lindemuthianum* During Bean Infection. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65 p. 1769-1771, 1993.
- COÊLHO, R. M. S.; SILVA, H. P.; BRUNELLI, K. R. Controle genético da antracnose foliar em milho. **Fitopatol. Bras.** v. 26 n. 3, 2001.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos** – Companhia Nacional de Abastecimento. Observatório Agrícola. SAFRA 2013/2014, 2014.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, Oitavo Levantamento Maio 2013**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília: CONAB, 2013.
- CONTINA, J. B.; DANDURAND, L. M.; KNUDSEN, G. R. Use of GFP-tagged *Trichoderma harzianum* as a tool to study the biological control of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied Soil Ecology** v. 115 p. 31-37, 2017.
- COSTA, R. V. da et al. Races of *Colletotrichum graminicola* Pathogenic to Maize in Brazil. **Crop Protection**, v. 56 p. 44-49, 2014.
- COTA, L. V. et al. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. **J. Phytopathol.** v. 160 p. 680–684, 2012.
- COVERT, S. F. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycol Res** v. 105 p. 259-264, 2001.
- COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental *cryptococcosis*. **Infect Immun** v. 68 p. 443–448, 2000.
- CRANFILL, P. J. et al. Quantitative assessment of fluorescent proteins. **Nature Methods** v. 13, p. 557-562, 2016.

CZYMMEK, K. J.; BOURETT, T. M.; HOWARD, R. Fluorescent Protein Probes in Fungi. **Methods in Microbiology**, v. 34, 2005.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology – **Molecular Plant Pathology** v. 13 n. 4 p. 414-430, 2012.

DEISING, H. B.; WERNER, S.; WENITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes Infect** v. 2 p. 1631-1641, 2000.

DYE, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* 1 The “amylovora” group. **New Zeal Journal Science**, v. 11, p. 590-607, 1968.

EISEL, D. et al. Dig Application Manual for Filter Hybridization. **Roche Diagnostics GmbH**, 2008.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. **Nature Protocols** v. 2 p. 953-971, 2007.

EMBRAPA – **Cultivo do Milho**, 2007 Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_3_ed/doencasfoliares.htm>. Acesso em 27/07/2015.

EMBRAPA – **Cultivo do Milho**, 2009 Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm>. Acesso em 13/10/2015.

EPSTEIN, L.; LUSNAK, K.; KAUR, S. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. **Fungal Genet Biol** v. 23 p. 189-203, 1998.

FAGARD, M. et al. Nitrogen metabolism meets phytopathology. **Jornal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, 2014.

FANG, E. G.; DEAN, R. A. Site-directed mutagenesis of the magB gene affects growth and development in *Magnaporthe grisea*. **Mol Plant-Microbe Interact** v. 13 p. 1214-1217, 2000.

FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 99, 2009.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/>>. Acesso em 12/09/2016.

FERNANDES, F. T. et al. **Cultivo do Milho: Podridões do Colmo e das Raízes**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 5 (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 60), 2005.

FIGUEIREDO, J. G. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods** p. 143-147, 2010.

FREITAG, M. et al. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology** v. 41 p. 897-910, 2004.

FUJIWARA, S. et al. Subcellular distribution of hepatic allantoinase varies among fishes. **Comp. Biochim. Physiol.** v. 93B, n. 2, 1989.

GASTEIGE, R. E. et al. **ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis** **Nucleic Acids**. v. 31 p. 3784-3788, 2003.

GENDREL, A. V. et al. Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. **Nat Methods** v. 2 p. 213-218, 2005.

GLIENKE, C.; KRIJGER, J.; DEISING, H. B. Functional Analysis of the Single-Copy Allantoicase and Urease Genes ALA1 and URE1 in Virulence of the Fungus *Colletotrichum graminicola* by Targeted Deletion Mutageneses. **International Plant Protection Congress IPPC**, p. 566, 2015.

GOULIN, E. H. et al. Identification of genes associated with asexual reproduction in *Phyllosticta citricarpa* mutants obtained through *Agrobacterium tumefaciens* transformation. **Microbiological Research** v. 192 p. 142-147, 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** v. 41 p. 95–98, 1999.

HODSON, R. C.; WILLIAMS, S. K.; DAVIDSON, W. R. JR. Metabolic control of urea catabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*. **J Bacteriol** v. 121 n. 3 p. 1022-1035, 1975.

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

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; DOMINGUEZ, H.; ROBERTBAUDOUY, J. Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology** v. 174 p. 7807–7818, 1992.

ISHIKAWA, F. H. **A função das anastomoses entre conídios na recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum***. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

KAHMANN, R.; BASSE, C. REMI (restriction enzyme mediated integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. **Eur J Plant Pathol** v. 105 p. 221-229, 1999.

KANAMORI, T. et al. Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase. **J Bacteriol** v. 186 n. 9 p. 2532-2539, 2004.

KHAN, A.; HSIANG, T. The Infection Process of *Colletotrichum graminicola* and Relative Aggressiveness on Four Turfgrass Species. **Canadian Journal of Microbiology** v. 49 n. 7, p. 433-442, 2003.

KIM, H. et al. Gene expression analyses of Arabidopsis chromosome 2 using a genomic DNA amplicon microarray. **Genome Res** v. 13 p. 327-340, 2003

KOO, J. et al. A GUS/Luciferase Fusion Reporter for Plant Gene Trapping and for Assay of promoter Activity with Luciferin-Dependent Control of the Reporter Protein Stability. **Plant Cell Physiol.** v. 48 n. 8 p. 1121-1131, 2007.

KREJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 9-21, 2009.

KRIJGER, J.J. et al. The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 21, p. 1325–1336, 2008.

KUBO, Y. et al. **Regulation of melanin biosynthesis genes during aplerorium formation by *Colletotrichum lagenarium*. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction.** St. Paul, MN: APS Press p. 99-113. 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2015.

Kurdistani, S. K.; Tavazoie, S.; Grunstein, M. **Mapping global histone acetylation patterns to gene expression.** Cell v. 117 p. 721-733, 2004.

LARGE, P. J.; WATERHAM, H. R.; VEENHUIS, M. Subcellular location of enzymes of purine breakdown in the yeast *Candida formata* grown on uric acid. **FEMS Microbiology Letters** p. 72, 1990.

LEE, I. R.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens. **FEMS Microbiol Lett** v. 345 p. 77-84, 2013a.

LEE, I. R. et al. **Characterization of Complete Uric Acid Degradation Pathway in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*** – Plos One, v. 8, 2013b.

LEULLIOT, N. et al. Crystal Structure of yeast Allantoicase Reveals a Repeated Jelly Roll Motif. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23447-23452, 2004.

LI, H. M.; ALTSCHMIED, L.; CHORY, J. *Arabidopsis* mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. **Genes Dev** v. 8 p. 339-349, 1994.

LOPEZ-BERGES, M. S. et al. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. **The Plant Cell** v. 22 p. 2459–2475, 2010.

LORANG, J. M. et al. Green Fluorescent Protein is Lighting Up Fungal Biology. **Appl Environ Microbiol** v. 67 p. 1987-1994, 2001.

- LU, S. et al. Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus hererostraphus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 91 p. 12649-12953, 1994.
- LUDIN, B. et al. Application of Novel Vectors for *GFP*-Tagging of Proteins to Study Microtubule-Associated Proteins. **Gene** v. 173, p. 107-111, 1996.
- LYSØE, E. et al. The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. **Appl Environ Microbiol** v. 72 p. 3924-3932, 2006.
- MANNERS, J. M. et al. The promoter of the plant defending gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. **Plant Mol Biol** v. 38 p. 1071-1080, 1998.
- MAOR, R. et al. Use of the Green Fluorescent Protein (*GFP*) for Studying Development and Fungal-Plant Interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycol. Res.** v. 102 p. 491-496, 1998.
- MAPA – **Ministério da Agricultura**, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em 21/10/2015.
- MARRIOTT, G.; PARKER, I. **Biophotonics**, Part B, Academic Press. v. 361, 2003.
- MENDGEN, K.; DEISING, H. B. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytol** v. 124 p. 193-213, 1993.
- MICHIELSE, C. B. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as tool for functional genomics in fungi. **Curr Genet** n. 48 p. 1-17, 2005.
- MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular Biology of Microbial Ureasas. **Microbiological Reviews**, Setembro, p. 451-480, 1995.
- MOLLENHAUER-REKTORSCHKE, M. et al. Expression of Urel is Required for Intragastic Transit and Colonization of Gerbil Gastric Mucosa by *Helicobacter pylori*. **Res Microbiol** v. 153, p. 659-666, 2002.
- MONTALBINI, P. Effect of rust infection on levels of uricase, allantoinase and ureides in susceptible and hypersensitive bean leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** p. 39, 1991.
- MULLINS, E. D.; KANGS, S. Transformation: a Tool for Studying Fungal Pathogens of Plant. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser Basel, v. 58, n. 14, p. 2043-2052, 2001.
- MÜNCH, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology** n. 165 p. 41-51, 2008.
- MÜNCH, S. et al. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Mol. Plant Pathology**. v. 12 p. 43-55, 2011.

NAVARATHNA, D. H. et al. Evolutionary aspects of urea utilization by fungi. **FEMS Yeast Res** v. 10 n. 2 p.209-213, 2010.

O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**. v. 44 n. 9, 2012.

OLIVEIRA-GARCIA, E.; DEISING, H. B. Infection Structure-Specific Expression of β -1,3-Glucan Synthase is Essential for Pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and Evasion of β -Glucan-Triggered Immunity in Maize. **The Plant Cell**, v. 25 p. 2356-2378, 2013.

OLIVEIRA-GARCIA, E.; DEISING, H. B. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthesis Genes *GPI12*, *GAA1*, e *GPI8* Are Essential for Cell-Wall Integrity and Pathogenicity of the Maize Antracnose Fungos *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29 n. 11, 2016.

OREN, L. et al. Early events in the *Fusarium verticillioides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-Expressing Transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69 p. 1695-1701, 2003.

ORR, K. A.; KNUDSEN, G. R. Use of green fluorescent protein and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsterile soil. **Phytopathology**. v. 94, n. 12, 2004.

PAGNI, M. et al. MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. **Nucleic Acids Res**. v. 32, 2004.

PANACCIONE, D. G.; MCKIERMAN, M.; HANAU, R. M. *Colletotrichum graminicola* Transformed with Homologous and Heterologous Benomyl-Resistance Genes Retains Expected Pathogenicity to Corn. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 1, n. 3 p. 113-120, 1988.

PARREIRA, D. F. et al. Method for *Colletotrichum graminicola* Inoculation in Maize Stalks. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 1 p. 53-64, 2016.

PEBERDY, J. F. **Fungal protoplast**. Bennett, J.W.; Lasure, L. L. (Ed.). More Gene Manipulations in Fungi. California: Academic Press. p. 307-318, 1991.

PHADNIS, S. H. et al. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. **American Society for Microbiology** p. 905-912, 1996.

PINTO, N. F. J. de A. Controle químico da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) do sorgo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p. 148-152, 2003.

PÖGGLER, S. et al. Versatile eGFP Reporter Plasmids for Cellular Localization of Recombinant Gene Products in Filamentous Fungi. **Curr Genet** v. 43, p. 54-61, 2003.

POLITIS, D. J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiological Plant Pathology** v. 3, p. 465-471, 1973.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos Morfológicos e Genéticos em *Guignardia spp* e *Phyllosticta spp***. p129 Tese (Doutorado em Genética) – Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

RAJANI, S.; SUNDARESAN, V. The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. **Curr. Biol.** V. 11 p. 1914–1922, 2001.

REDMAN, J. C. et al. **Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array**. Plant J n. 38 p. 545-561, 2004.

REN, B. et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. **Science** v. 290 p. 2306-2309, 2000.

RUTHERFORD, C. J. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. **PLOS Pathogens** v. 10, 2014.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3ª edição, v. 1, 2001.

SANTAMARIA, M. et al. The promoter of a basic PR1-like gene, AtPRB1, from Arabidopsis establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. **Plant Mol Biol** v. 47 p. 641-652, 2001.

SANZ-MARTIN, J. M. et al. A Highly Conserved Metalloprotease Effector Enhances Virulence in the Maize Anthracnose Fungus *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant Pathology**. v. 17, p. 1048-1062, 2016.

SCHLÜTER, U. et al. Maize Source Leaf Adaptation to Nitrogen Deficiency Affects Not Only Nitrogen and Carbon Metabolism but also Control of Phosphate Homeostasis. **Plant Physiology**, November v.. 160 p. 1384-1406, 2012.

SCHUBELER, D. et al. The histone modification pattern of active genes revealed through genome wide chromatin analysis of a higher eukaryote. **Genes Dev** v. 18 p. 1263-1271, 2004.

SCHUMACHER, J. et al. The Transcription Factor BcLTF1 Regulates Virulence and Light Responses in the Necrotrophic Plant Pathogen *Botrytis cinerea*. **Plos Genetics**, 2014.

SIGRIST, C. J. A. et al. New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic Acids Res.** 2012.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova** v. 32 n. 2, 2009.

SPRINGER, P. S. Gene traps: tools for plant development and genomics. **Plant Cell** v. 12 p. 1007-1020, 2000.

STROPE, P. K. et al. Molecular evolution of urea amidoliasis and urea carboxylase in fungi. **BMC Evolutionary Biology**, p. 11-80, 2011.

SUGUI, J. A.; DEISING, H. B. Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. **Mol. Plant Pathol.** V. 3, p. 197–203, 2002.

TAKADA, Y.; TSUKIJI, N. Peroxisomal localization and activation by bivalent metal ions of ureidoglycolate lyase, the enzyme involved in urate degradation in *Candida tropicalis*. **Journal of Bacteriology**, 1987.

TALBOT, N. J. et al. Nitrogen Starvation of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea* May Act as an Environmental Cue for Disease Symptom Expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 179-195, 1997.

THERMOFISHER – **CloneJET PCR Cloning Kit**. Disponível em:
<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>> Acesso em 30/10/2015.

THIBAUD-NISSEN, F. et al. Development of Arabidopsis whole-genome microarrays and their application to the discovery of binding sites for the TGA2 transcription factor in salicylic acid-treated plants. **Plant J** v. 47 p.152-162, 2006.

TORRES, M. F. et al. A *Colletotrichum graminicola* Mutant Deficient in the Establishment of Biotrophy Reveal Early Transcriptional Events in the Maize Anthracnose Disease Interaction. **BMC Genomics**, v. 17, p. 202, 2016.

USUDA, N. et al. Uric acid degrading enzymes, urate oxidase and allantoinase, are associated with different subcellular organelles in frog liver and kidney. **Journal of Cell Science** p. 107, 1994.

VICENTE-AGULLO, F. et al. Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. **Plant J**, v. 40 p.523-535, 2004.

VOGELS, G. D.; DRIFT, C. can der Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriol Rev** n. 40 p. 403–468, 1976.

WANG, C.-L.; SHIM, W.-B; SHAW, B. D. The *Colletotrichum graminicola* striatin orthologue Str1 is necessary for anastomosis and is a virulence factor. **Molecular Plant Pathology**, 2015.

WEIHMANN, F. et al. Correspondence Between Symptom Development of *Colletotrichum graminicola* and Fungal Biomass, Quantified by a Newly Developed qPCR Assay, Depends on The Maize Variety. **BMC Microbiology**, 2016.

WISMAN, E.; OHLROGGE. J. Arabidopsis microarray service facilities. **Plantphysiol** n. 124 p. 1468-1471, 2000.

WONG, S.; WOLFE, K. H. Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. **Nature Genetics**, v. 37 n. 7, 2005.

XIAO, Y-L. et al. High throughput generation of promoter reporter (GFP) transgenic lines of low expressing genes in Arabidopsis and analysis of their expression patterns. **Plant Methods** p. 6-18, 2010.

XU, C. et al. Polymerase Chain Reaction-Hybridization Method Using Urease Gene Sequences for High-Throughput *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* Detection and differentiation. **Analytical Biochemistry**, v.. 499, p. 57-62, 2016.

YANG, F.; MOSS, G.; MAHESWARAN, G. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nat. Biotechnol.** V.. 14, p. 1246-1251, 1996.

YU, J. et al. Double-Joint PCR: a PCR-Based Molecular Tool for Gene Manipulations in Filamentous Fungi. **Fungal Genetics and Biology** v. 41, p. 973-981, 2004.

YUST, I. et al. Temporary Inhibition of Antibody-Dependent, Cell-Mediated Cytotoxicity by Pretreatment of Human Attacking Cells with Ammonium Chloride. **The Journal of Immunology**, n. 116 v. 4 p. 1170-1172, 1976.

ZHANG, N. et al. An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**. Vol. 98(6), p. 1076-1087. 2006.

ZHANG, W.; STOTT, P.; ZHANG, M. **The moose, purine degradation, and environmental adaptation.** Wue J Wildl Red p. 60-937-939, 2014.

ZHANG, Y.-J. et al. **Establishment of polyethylene-glycol-mediated protoplast transformation for *Lecanicillium lecanii* and development of virulence-enhanced strains against *Aphis gossypii*.** SCI, 2016.

ZHU, T.; WANG, X. Large-scale profiling of the Arabidopsis transcriptome. **Plant Physiol**, p. 124:1472-1476, 2000.

ANEXOS

Anexo A – Lista de meios de cultura

- MEIO BDA

200 g de batata descascada e fatiada
20 g Dextrose
15 g Ágar
1 L água destilada

Cozinhar as batatas descascadas e fatiadas por 30 min em 0,5 L de água, filtrar e manter o caldo. Adicionar os outros componentes e completar com água destilada para 1 L. Autoclavar por 20 min , 121 °C.

- MEIO OMA:

50 g de aveia em pó orgânica
12 g de ágar
1 L de água destilada (não é necessário completar para 1L, somente

adicionar)

Autoclavado a 121 °C por 40 min.

- MEIO YES:

1 g/L de extrato de levedura
500 mM de sacarose
Autoclavado a 121 °C por 20 min.

- MEIO TOP ÁGAR:

1 M de sacarose
1 g/L de extrato de levedura
1 g/L de caseína hidrolisada
6 g/L ágar
Autoclavado a 121 °C por 20 min.

- MEIO COMPLETO:

Solução estoque A:
50 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Completar para 500 mL de água destilada
Autoclavado a 121 °C por 20 min.

Solução estoque B:
10 g KH_2PO_4
12,5 g MgSO_4
2,7 g NaCl
Completar para 500 mL de água destilada
Autoclavado a 121 °C por 20 min.

MEIO:

10 mL solução estoque A
10 mL solução estoque B
10 g glicose
1 g de extrato de levedura
1 g Peptona
Completar para 1 L de água destilada

- MEIO UREIA/ALANTOINA

Solução 1:

0,5 g Na_2HPO_4
0,5 g K_2HPO_4
0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10 mL solução NaCl 10%
1 g Extrato de Levedura
2,5 mL solução Azul bromotimol 0,5%
150 g ágar
q.s.p. 800 mL Água destilada
pH 5,8
Autoclavado a 121 °C por 20 min.

Solução 2:

330 mM Ureia ou 145 mM Alantoina
180 mL de Água destilada
Esta solução deve ser filtrada em membrana de 0,22 μm .

Quando a temperatura da solução 1 estiver menor que 45 °C, e ainda não solidificado, misturar as duas soluções (DYE, 1968).

- MEIO YNB

0.45% yeast nitrogen base w/o amino acids ammonium sulfate
2% glicose
10 mM fonte de nitrogênio (Ácido úrico, alantoína, ureia ou sulfato de amônio)

Anexo B – Lista de soluções

- STC

1 M de sorbitol (D-Sorbitol)

500 mM de CaCl_2

10 mM de Tris-HCl pH 8,0

Essa solução deve ser filtrada em membrana de 0,45 μm e armazenada em temperatura ambiente.

- SOLUÇÃO DE PROTOPLASTIZAÇÃO

440 mg de Lyse-Enzyme de *Trichoderma harzianum*

22 μL de β -mercaptoethanol

22 μL de ampicilina

22 mL de NaCl 0,7 M

- PEG

40% (w/v) PEG4000

50 mM de Tris-HCl pH 8,0

0,6 M de KCl

50 mM de CaCl_2

Completar para 50 mL de água destilada

Essa solução deve ser filtrada em membrana de 0,45 μm e armazenada em temperatura ambiente.

- Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (50x)

2 M TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol)

57,1 mL ácido acético glacial

100 mL de solução de EDTA dissódico (Na_2EDTA) 0,5 M (pH 8.0)

Água destilada até 1 litro

Na_2EDTA :

18,61 g de etilenodiaminotetraacetato dissódico

80 mL de água destilada

Ajustar pH 8,0 com NaOH

Autoclavado a 121 °C por 20 min.