



SUELLEN FINAMOR MOTA

**PROTEÍNA SOFT NA FORMAÇÃO DE CATS EM ESPÉCIES
DE *Colletotrichum* DO FEIJOEIRO**

LAVRAS – MG

2017

SUELLEN FINAMOR MOTA

**PROTEÍNA SOFT NA FORMAÇÃO DE CATS EM ESPÉCIES DE *Colletotrichum* DO
FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mota, Suellen Finamor.

Proteína SOFT na formação de CATs em espécies de
Colletotrichum do feijoeiro / Suellen Finamor Mota. - 2017.
57 p.: il.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza..

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Antracnose. 2. Comunicação celular. 3. *Glomerella* sp. I.
Souza, Elaine Aparecida de.. II. Título.

SUELLEN FINAMOR MOTA

**PROTEÍNA SOFT NA FORMAÇÃO DE CATS EM ESPÉCIES DE *Colletotrichum* DO
FEIJOEIRO**

**SOFT PROTEIN IN THE CATS FORMATION IN *Colletotrichum* SPECIES FROM
COMMON BEAN**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 25 de Abril de 2017.

Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz	UFV
Profa. Dra. Francine Hiromi Ishikawa	UNIVASF
Dra. Maria Cristina Mendes-Costa	
Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA

Dra. Elaine Aparecida de Souza
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

*Aos meus pais, Silvino e Marley, pelo amor, compreensão, apoio e paciência;
À minha irmã, Samira, pelo companheirismo de toda vida e por toda paciência e amor!
Ao meu marido por estar comigo nestes anos de doutorado me apoiando;
À tia. Márcia, (in memoriam) que sempre estará em meu coração...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus que está sempre presente em minha vida, me guiando, confortando nas horas difíceis e abençoando em cada conquista alcançada.

Aos meus pais e minha irmã que sempre estiveram ao meu lado apoiando, incentivando e sofrendo em cada momento da minha Vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À *Technische Universität Braunschweig* (Alemanha) e ao *Fungal Cell Biology Group*, por ter me recebido como estudante visitante e permitido o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudos no país e no exterior (doutorado sanduíche).

À professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza, pelos ensinamentos transmitidos e orientação desde a graduação.

Ao prof. Andre Fleissner, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na *Technische Universität Braunschweig*, pela orientação e valiosas contribuições a este trabalho.

À Dra. Gabriela Roca, por ter aberto as portas para o doutorado sanduíche para esta fascinante área. Muito obrigada por ter sido mais que orientadora, não só no período que estive em Braunschweig, mas em todo meu doutorado, sempre muito prestativa e amiga.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de deslocamento e pelas valiosas contribuições para o nosso trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Patrícia Gomes pela amizade, conselhos e sugestões na condução dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, que trabalharam comigo desde a graduação até o Doutorado, principalmente a Joyce, Mariana Andrade, Francine, Mariana Junqueira, Paulinho, Miller, Samira e Quel, pela ajuda, conselhos, sugestões, amizade e convivência diária.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Ao professor Eduardo Alves e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, que permitiram a realização de parte dos trabalhos.

Aos colegas do *Cell Cell communication Group* da *Technische Universität Braunschweig* Antonio, Marcel, Steph, Martin, Uricke e Lisa, pela convivência e por terem me recebido, sempre muito prestativos.

Aos funcionários do DBI, Zélia, Rafaela e Ironcina, pela convivência e auxílio durante o curso. A secretária Lilian, por todo auxílio, disponibilidade e amizade durante esses anos.

A todos os colegas do GEN que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização desse trabalho e pela excelente convivência.

Aos meus queridos amigos, muitos já distantes, mas que guardo com muito carinho no coração, Camila, Thaise, Prosa, Kaio Mala, Zé Maria, Fran, Chico Moita, Indalécio, Gaby, pelos ótimos momentos que passamos juntos e companheirismo durante todos esses anos.

Aos amigos que fiz durante tempo na Alemanha e que vou levar para toda vida, assim como meus amigos de infância que sempre estiveram presentes mesmo na minha ausência física. As companheiras de república em Lavras, Isis, Evelize, Lauziene, Rafa, Aline, Aninha e Carol que fizeram a minha vida mais alegre.

Ao meu marido, Ricardo, pelo amor, companheirismo, cumplicidade, compreensão e confiança durante esses anos.

A todos aqueles que estiveram perto de mim e que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho e pela convivência, o meu muito obrigado!

RESUMO

A antracnose do feijoeiro é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. No entanto, linhagens de *Glomerella* sp. não patogênicas têm sido isoladas de lesões de antracnose e não correspondem à fase sexual de *C. lindemuthianum*. Essas espécies formam tubos de anastomoses entre conídios (CATs), que são estruturas especializadas que emergem como protuberâncias dos conídios após ou durante a germinação, dependendo da espécie. A fusão de CATs permite que haja a comunicação entre citoplasmas de dois ou mais conídios podendo ocorrer a transferência de organelas, tais como, mitocôndrias e também de núcleos. Em *Neurospora crassa*, sabe-se que duas proteínas, SOFT (SO) e MAK-2, são responsáveis pela comunicação dos conídios e a fusão de CATs. No entanto, não há informações do papel dessas proteínas em *C. lindemuthianum*. Este trabalho teve como objetivos caracterizar a formação de CATs nestas espécies, localizar os genes *clsoft* e *glso* (*clso* e *glso*), sequenciar, expressar e estudar as proteínas CLSO e GLSO durante a formação de CATs e também, observar os efeitos do gene inativado, principalmente na patogenicidade. Além disso, observar a ocorrência de CATs entre as espécies/linhagens estudadas. Foram utilizadas as linhagens LV134 da raça 65 de *C. lindemuthianum* e G7-2 de *Glomerella* sp. O gene *clso* e *glso* foi isolado, sequenciado e as linhagens foram transformadas com o gene *clso* ligado à proteína GFP. Este gene também foi inativado pela técnica de recombinação e clonagem por leveduras. Todas as linhagens selvagens e transformadas de ambas as espécies foram caracterizadas quanto ao índice de velocidade crescimento micelial, diâmetro colonial, taxa de esporulação, porcentagem de germinação e teste de patogenicidade. Ambas as espécies foram uninucleadas antes e após a germinação dos esporos. As linhagens apresentaram incompatibilidade micelial e sexual, no entanto, houve formação de CATs entre e dentro das espécies avaliadas. Além disso, não ocorreu especificidade na escolha do parceiro de fusão. Observou-se também que a melhor temperatura para a formação de CATs foi de 20°C. As proteínas CLSO e GLSO apresentaram recrutamento oscilatório e foram essenciais na formação de CATs nas espécies *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp., respectivamente. As proteínas CLSO e GLSO não apresentaram efeito pleiotrópico para as características avaliadas. Os resultados sugerem que a formação de CATs pode estar contribuindo para o aumento da variabilidade e surgimento de novas espécies de *Colletotrichum* no feijoeiro.

Palavras-chaves: Antracnose; comunicação celular; *Glomerella* sp.; Tubos de anastomose entre conídios

ABSTRACT

Anthrachnose of common bean is caused by *Colletotrichum lindemuthianum* fungi. However, *Glomerella* sp., no pathogenic strains have been isolated from anthracnose lesions and do not correspond to sexual form of *C. lindemuthianum*. These species form conidial anastomosis tubes (CATs), which are specialized structures that emerge as protuberances of conidia after or during germination, depending on species. CATs fusion allows communication between cytoplasm of two or more conidia and organelles transference can occur, such as mitochondria and nuclei. Two proteins, SOFT (SO) and MAK-2, are responsible for conidia communication and CATs fusion in *Neurospora crassa*. However, there is no information about these proteins in *C. lindemuthianum*. Objective of this study was to characterize CATs formation in these species, localize, sequence and express the *clsoft* and *glsoft* (*clso* and *glso*) gene, study the CLSO and GLSO protein during CATs formation, and also to observe the effects of silenced gene, mainly in pathogenicity. In addition, to observe CATs occurrence among species/strains studied. The LV134 strain of *C. lindemuthianum*, race 65 and G7-2 strain of *Glomerella* sp. were used. *clso* and *glso* gene were isolated, sequenced and strains were transformed with *so* gene linked with GFP protein. These gene were also silenced by yeast cloning and recombination technique. All wild type and transformed strains of both species were characterized for Index of mycelial growth rate, colonial diameter, sporulation rate, germination percentage and pathogenicity test. Both species were uninucleated before and after spore germination. Strains presented mycelial and sexual incompatibility, however, there were CATs formation between and within evaluated species. In addition, no specificity occurred in the choice of fusion partner. It was also observed that the best temperature for CATs formation was 20°C. CLSO and GLSO protein presented oscillatory recruitment and were essential in CATs formation in *C. lindemuthianum* and *Glomerella* sp. Species, respectively. CLSO and GLSO protein did not present a pleiotropic effect for evaluated traits. Results suggest that CATs formation may be contributing to variability increase and emergence of new *Colletotrichum* species in common bean.

Keywords: Anthracnose; Cellular communication; *Glomerella* sp.; Conidial anastomosis tubes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da técnica de recombinação e clonagem por leveduras para o gene <i>clso</i>	30
Figura 2 Conídios uninucleados antes (A e C) e depois da germinação (B e D) na linhagem de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp. usando DAPI.....	34
Figura 3 Observação de núcleos e mitocôndrias durante a formação de CATs na linhagem LV134 de <i>C. lindemuthianum</i>	35
Figura 4 Incompatibilidade micelial e sexual entre e dentro das linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp.....	35
Figura 5 Dendograma de identidade genética para o gene <i>so</i> entre espécies de <i>Colletotrichum</i> e outras espécies de fungos filamentosos.	37
Figura 6 Localização da proteína CLSO nas pontas dos conídios em comunicação celular para a formação de CATs na espécie <i>C. lindemuthianum</i> (LV134).	38
Figura 7 Recrutamento oscilatório da proteína GLSO nas pontas dos conídios em formação de CATs da espécie <i>Glomerella</i> sp. (G7-2). Durante a interação celular, GLSO é recrutada do citoplasma para a ponta do conídio em formação de CATs e após 10-20 min, o sinal muda para o outro parceiro de fusão até fundir.	39
Figura 8 Localização da proteína CLSO após a fusão de CATs na espécie <i>C. lindemuthianum</i> (B) e após algum tempo a proteína desaparece do ponto de fusão e apresenta apenas difusa no citoplasma (D).	39
Figura 9 Mutantes <i>clso</i> e <i>glso</i> apresentaram crescimento no entanto, não foi direcionado, não ocorrendo a fusão de CATs em ambas as espécies/linhagens de <i>Colletotrichum</i>	40
Figura 10 Sintomas de antracnose causados pelas linhagens selvagens, com genes inativados e depois quando os genes foram restaurados em <i>C. lindemuthianum</i> (A-C) e <i>Glomerella</i> sp. (D-F) na cultivar Pérola do feijoeiro.	42
Figura 11 Formação de CATs entre e dentro as espécies de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp., sendo que foi utilizada a linhagem selvagem LV134 e a linhagem G7-2 transformada para expressar a proteína GLSO+GFP.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies pertencentes das linhagens utilizadas no estudo, doença causada no feijoeiro e o tipo de esporo que foi isolado.	27
Tabela 2 Concentração, seletividade e excitação/emissão de comprimento de onda (nm) para cada corante fluorescente.	28
Tabela 3 Primers usados para a amplificação dos genes <i>clso</i> e <i>glso</i> e clonagem do gene no plasmídeo.	29
Tabela 4 Porcentagem de identidade da sequência do gene <i>so</i> entre as linhagens das espécies estudadas com outras espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> e <i>N. crassa</i>	37
Tabela 5 Porcentagem de formação de CATs das linhagens selvagens e após os genes serem restaurados e as estimativas dos limites inferiores e superiores.....	40
Tabela 6 Caracterização das espécies <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp. para as características Taxa de esporulação ($\times 10^6$ conídios/mL), diâmetro colonial (mm), Índice de Velocidade do crescimento micelial (IVCM-mm/dia) e Porcentagem de Germinação (%) para as linhagens selvagens, com os genes inativados e após gene serem restaurados.	41
Tabela 7 Porcentagem de fusão de CATs dentro e entre as espécies <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp. (Linhagens LV134 e G7-2+ <i>glso</i> + <i>gfp</i> , respectivamente).	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Antracnose do feijoeiro	15
2.2 <i>Colletotrichum</i> no feijoeiro comum	16
2.3 Origem da Variabilidade em <i>Colletotrichum</i>	18
2.4 Anastomose entre conídios	20
2.5 CATs em <i>Colletotrichum</i> do feijoeiro	23
2.6 Proteína SO (SOFT)	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Caracterização das linhagens	227
3.1.1 Caracterização citológica	27
3.1.2 Compatibilidade sexual e micelial	28
3.1.3 Caracterização da formação de CATs	28
3.2 Localização gene <i>so</i> e estudo da fusão e comunicação celular	28
3.2.1 Localização do gene <i>so</i>	29
3.2.2 Construção do plasmídeo	29
3.2.3 Preparação do cassete para silenciamento gênico	29
3.2.4 Transformação genética das linhagens	30
3.2.5 Comunicação e formação dos CATs	31
3.3 Avaliação do silenciamento do gene <i>so</i> na formação dos CATs	31
3.4 Caracterização dos transformantes	32
3.4.1 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial	32
3.4.2 Taxa de esporulação e Porcentagem de Germinação	32
3.4.3 Teste de patogenicidade	33
3.5 Formação CATs entre as espécies	34
4 RESULTADOS	34
4.1 Caracterização das linhagens de <i>C. lindemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp.	34
4.1.1 Caracterização citológica	34
4.1.2 Compatibilidade sexual e micelial	35
4.1.3 Caracterização de CATs	36
4.2 Localização do gene <i>so</i> e análise da fusão e comunicação celular	36
4.2.1 Caracterização molecular do gene <i>so</i>	37

4.2.2 Comunicação e formação dos CATs	38
4.3 Avaliação do silenciamento do gene <i>so</i> na formação dos CATs	40
4.4 Caracterização dos transformantes	40
4.4.1 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial	41
4.4.2 Taxa de esporulação e porcentagem de germinação	41
4.4.3 Teste de patogenicidade	41
4.5 Formação de CATs entre as espécies <i>C. lidemuthianum</i> e <i>Glomerella</i> sp.	42
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produtividade do feijoeiro, destaca-se a ocorrência de doenças, - uma das principais é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Nos últimos anos, vêm sendo isoladas linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. de lesões de antracnose (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016). A análise comparativa de caracteres morfológicos, moleculares e testes de patogenicidade dessas linhagens têm mostrado ampla variabilidade e comprovado que as linhagens de *Glomerella* sp. não representam a forma teleomórfica de *C. lindemuthianum* (BARCELOS et al., 2014). Esses autores identificaram dois grupos distintos de linhagens de *Glomerella* sp. coletados de lesões de antracnose no feijoeiro, denominados de *Glomerella* sp. grupo I e II. O grupo *Glomerella* sp. I amplifica para os primers HMGglo (BARCELOS; SOUZA; VAILLANCOURT, 2011) e não para o par de primers específicos de *C. lindemuthianum* (GARCIA-SERRANO et al., 2008) e não causam sintomas no feijoeiro aos dez dias de avaliação. No entanto, um grupo de seis linhagens do grupo II não amplificou para ambos os primers e causou sintomas brandos no feijoeiro. A patogenicidade dessas seis linhagens foi investigada por Mota et al. (2016) e causaram sintomas típicos nas vagens do feijoeiro comum de sarna do feijoeiro, doença emergente também causada pelo gênero *Colletotrichum*, mas ainda pouco estudada.

C. lindemuthianum produz um tipo de hifa especializada que permite a fusão de conídios, conhecida como tubos de anastomoses entre conídios (*Conidial Anastomosis Tubes* - CATs) (ROCA et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2010a). Dentre suas funções tem sido sugerido o favorecimento da recombinação assexual e a transferência horizontal de genes (ROCA et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2010a, 2010b; MEHRABI et al., 2011; ISHIKAWA et al., 2012). Assim, a ocorrência de diferentes espécies na mesma lesão no feijoeiro e que pertencem ao gênero *Colletotrichum* pode favorecer a formação de CATs entre essas espécies, uma vez que estão bem próximas uma da outra e não ocorre a reprodução sexuada. Contudo, não há informações detalhadas sobre o processo de formação de CATs nas espécies de *Colletotrichum*, isto é, características específicas envolvidas no processo de sinalização celular ou na comunicação celular. O patossistema *C. lindemuthianum/Phaseolus vulgaris* é um modelo no estudo de fitopatógenos, e, além disso, os CATs foram descritos com detalhes pela primeira vez nessa espécie (ROCA et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2012, READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012; BARCELOS et al., 2014). Apesar da observação e descrição sobre os CATs em *Neurospora crassa* ter sido relatada posteriormente (ROCA et

al., 2005), informações detalhadas sobre a comunicação e fusão celular de CATs nessa espécie têm sido investigadas com maiores detalhes. Devido a ser um fungo com genoma sequenciado, possui metodologias bem estabelecidas, assim, um fungo modelo para estudos (FLEISSNER et al., 2009). Os genes *map kinase-2* (*mak-2*) e *soft* (*so*) são responsáveis pela formação das proteínas de membranas MAP KINASE (MAK-2) e da SOFT (SO) e estão envolvidos na formação dos CATs em *N. crassa* (FLEISSNER et al., 2009). Nessa espécie, ocorre crescimento quimiotrópico entre os conídios envolvidos na formação de CATs. O recrutamento de MAK-2 e SO é alternado entre os parceiros de fusão em um sistema altamente coordenado. A dinâmica oscilatória de sinalização entre essas proteínas ocorre nas pontas dos CATs em formação e com um único ponto na fusão (FLEISSNER et al., 2009). Essas observações indicam que os parceiros de fusão se alternam entre dois estados fisiológicos que envolvem o envio e recepção de sinais. Portanto, é um sistema de sinalização refinada e de desenvolvimento, isso permite que células geneticamente idênticas coordenem o seu comportamento temporal e espacial para alcançar a fusão e atração mútua, evitando o autoestímulo. Nessa espécie também foi observado que a inativação de apenas um desses genes, impede a formação e fusão de CATs (FLEISSNER et al., 2009).

MAK-2, além de ser essencial para a anastomose de hifas e conídios, também são fatores patogênicos em vários fitopatógenos, incluindo *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (XU; HAMER, 1996, ZHENG et al., 2000; DI PIETRO et al., 2001). A proteína SO é conservada nos fungos filamentosos Ascomycetes, mas a sua função molecular, ainda, permanece obscura (WEICHERT; FLEISSNER, 2015). A função da SO na formação de anastomoses tem sido conservada em fungos de diferentes estilos de vida, como o fungo saprófita *Sordaria macrospora*, os fitopatógenos *Alternaria brassicicola* e *Fusarium oxysporum* e o endofítico *Epichloe festucae* (CRAVEN et al., 2008; PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008; CHARLTON et al., 2012; ENGH et al., 2007). Essa proteína também está envolvida na interação fungo-hospedeiro, uma vez que em *A. brassicicola* é essencial para a patogenicidade. Em *E. festucae*, a deleção do gene *so* causa um distúrbio e o fungo torna-se patogênico, no entanto, em *F. oxysporum* a patogenicidade não é afetada (ENGH et al., 2007; PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008; CHARLTON et al., 2012).

As espécies *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. coabitam as mesmas lesões no feijoeiro, podendo ter um grande impacto na evolução das espécies, além de dificultar o controle da doença no feijoeiro. Portanto, torna-se importante entender a formação de CATs e se os mesmos ocorrem entre as espécies presentes nas mesmas lesões de antracnose. Assim, os objetivos deste trabalho foram: *i.* caracterizar a formação de CATs nestas espécies, *ii.*

localizar os genes *clso* e *glso*, sequenciar, expressar e estudar as proteínas CLSO e GLSO durante a formação de CATs, *iii.* observar os efeitos dos genes inativados, principalmente na patogenicidade, *iv.* observar a ocorrência de CATs entre as espécies/linhagens estudadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antracnose do feijoeiro

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro em regiões subtropicais e temperadas, especialmente em localidades com temperaturas moderadas a frias (13- 27°C) e alta umidade relativa (acima de 91%) (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). As perdas ocasionadas por essa doença podem ser da ordem de 100%, principalmente quando sementes contaminadas ou cultivares suscetíveis são utilizados para plantio e ocorrem períodos prolongados de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (PINTO et al., 2012). Além de diminuir o rendimento da cultura, os sintomas da antracnose depreciam a qualidade do produto, por ocasionarem manchas nos grãos, tornando-os impróprios para o consumo (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

Os sintomas da antracnose aparecem em todos os estágios de crescimento na parte aérea da planta, a partir de cinco dias do contato com o fungo (CHAVES, 1980; KIMATI et al, 1997). O patógeno pode afetar as sementes, produzindo lesões nos tecidos dos cotilédones. As sementes infectadas são ligeiramente descoloridas, podendo apresentar cancrós, cuja coloração varia de amarela a café-escuro ou negra (SARTORATO, 1988; SCHAWARTZ, 1994). No pecíolo e no caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura (SARTORATO, 1988). Nas folhas, as lesões ocorrem, inicialmente, na face abaxial, ao longo das nervuras, como pequenas manchas de cor pardo-avermelhada que se tornam café-escuro a negra. Nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas e apresentam o centro claro, delimitado por um anel negro levemente protuberante, rodeado por uma borda de coloração laranja-avermelhada. Essas lesões podem coalescer e cobrir parcialmente as vagens. Sob temperatura e umidade adequadas, observa-se a esporulação rosada no centro das lesões (SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994).

O agente causal da antracnose é conhecido por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn.) Briosi & Cav. e a disseminação desse patógeno ocorre a curta distância por meio de respingos de chuvas, implementos agrícolas, homem, insetos e vários outros agentes, e a

longa distância, por meio de sementes infectadas (VIEIRA; VIEIRA; RAMOS, 1993). Essas sementes representam a maior fonte de inóculo do ponto de vista epidemiológico, além de promover o intercâmbio de diferentes raças entre as diversas regiões produtoras (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; SILVA, 2004). O patógeno sobrevive de uma estação a outra, ou de um cultivo a outro, como micélio dormente no interior do tegumento da semente nas células dos cotilédones ou em restos culturais, na forma de esporos (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

Para o sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes à antracnose, algumas informações são necessárias, entre elas destacamos o conhecimento dos níveis de variabilidade dentro e entre populações do patógeno e a determinação das raças predominantes em cada região de cultivo do feijoeiro comum (RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2003; PINTO et al., 2012).

2.2 *Colletotrichum* no feijoeiro comum

Colletotrichum é um grande gênero pertencente à Classe dos Ascomycetos (Glomerellaceae, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Ascomycota), este abrange muitas espécies que causam a antracnose em muitas culturas (BAILEY; JEGER, 1992). O foco do sistema de classificação é o estado anamórfico do gênero, uma vez que o teleomórfico é comum apenas em poucas espécies do gênero (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000). Os fungos filamentosos possuem ampla distribuição geográfica, os maiores danos ocorrem em ambientes quentes e úmidos, ou seja, nas regiões tropicais e subtropicais (WALLER, 1992). O gênero foi recentemente eleito o oitavo mais importante grupo de fungos patogênicos de plantas no mundo (DEAN et al., 2012).

O conídio do *Colletotrichum* é uma célula única, não tem cor e mostra diferentes formas, por exemplo, ovoide, cilíndrico ou em forma de haltere, dependendo das espécies. Na área onde cresce um grande número de conídios, é visível a coloração cor-de-rosa ou salmão. Os acérvulos, em que são formados os conídios, desenvolvem-se sob a epiderme do tecido da planta infectada, e devido ao seu crescimento, vão perfurar a epiderme, libertando assim um grande número de conídios que servem para difundir o patógeno (AGRIOS, 2005).

As espécies de *Glomerella* formam peritécios, ascos e ascósporos. Cada uma dessas estruturas pode variar em tamanho e forma, dependendo das espécies (AGRIOS, 2005; ARMSTRONG-CHO; BANNIZA, 2006; GUERBER; CORRELL, 2001). Rodriguez e

Redman (1992) relataram que o número de ascos num peritécio variou de 5 a 8 em *G. musae*. Dentro de um asco, oito ascósporos são produzidos e têm sido observadas nas espécies *G. graminicola*, *G. musae*, *G. acutata*, e *G. truncata* (ARMSTRONG-CHO; BANNIZA, 2006; GUERBER; CORRELL, 2001; RODRIGUEZ; REDMAN, 1992).

C. lindemuthianum é um patógeno hemibiotrófico intracelular e se reproduz assexuadamente. Os conídios são produzidos num corpo de frutificação denominado acérvulo e formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, são unicelulares, hialinos e oblongos ou cilíndricos e germinam de seis a nove horas após o contato inicial com o caule (KIMATI, 1997). O patógeno apresenta grande variabilidade morfológica, fisiológica e citológica e também ampla diversidade de virulência, o que justifica o elevado número de raças fisiológicas existentes e a complexidade no emprego da resistência genética (PEREIRA et al., 2010; PINTO et al., 2012). Essa alta variabilidade torna essencial o monitoramento constante desse patógeno para auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de novas cultivares resistentes de feijão, como principal alternativa no controle da doença (CARBONELL et al., 2012; ISHIKAWA, SOUZA, DAVIDE, 2008).

Na fase teleomórfica do *C. lindemuthianum*, o fungo é conhecido como *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* Stonem Spauld & V. Schrenk (KIMATI; GALLI, 1970). O fungo produz um corpo de frutificação denominado peritécio e dentro estão os ascos (BAILEY; JEGER, 1992). Ampla variabilidade para diversas características de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* tem sido relatada, como por exemplo, o tamanho de ascósporos e conídios. Para os ascósporos, o comprimento varia de 18,26- 38,85 µm e para largura de 4,94-10,4 µm (ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Os conídios variam no comprimento de 13-22 µm e a largura varia de 2,86-4,75 µm (BARCELOS et al., 2014; O'CONNELL; NASH; BAILEY, 1992; RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003).

Nos últimos anos, têm sido obtidas linhagens de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (forma teleomórfica) a partir de lesões de antracnose e essas linhagens têm sido investigadas por meio de caracterização, morfológica, citológica, molecular e patogênica (BARCELOS et al., 2014). Os autores identificaram dois grupos distintos de linhagens de *Glomerella* sp. coletados de lesões de antracnose no feijoeiro, denominados *Glomerella* sp. grupo I e II, o grupo I não causou sintomas no feijoeiro comum aos dez dias após a inoculação e amplificou para os primers específicos para *G. cingulata*, HMGglo (BARCELOS; SOUZA; VAILLANCOURT, 2011). No entanto, o grupo II apresentou sintomas brandos aos 10 dias após a inoculação e não amplificou para o primer específico HMGglo. Assim, há evidência

que *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* relatadas neste estudo, provavelmente não é a fase sexual do *C. lindemuthianum*, portanto uma nova espécie, que co-habita lesões de antracnose no feijoeiro, uma vez que a partir das lesões são isoladas ambas as formas do patógeno. Mota et al. (2016) ao estudar essas linhagens e também linhagens isoladas de lesões da sarna do feijoeiro, observaram que as linhagens de *Glomerella* sp. grupo II e as linhagens isoladas de sarna causaram doença no feijoeiro, após 17 dias de inoculação e apresentaram sintomas típicos da sarna do feijoeiro, doença também causada por espécie pertencente ao gênero *Colletotrichum*.

2.3 Origem da Variabilidade em *Colletotrichum*

A alta variabilidade das espécies de *Colletotrichum* é apresentada pela morfologia da colônia, forma dos conídios, presença e forma de setas, apressórios, pigmentação, patogenicidade, além de outras características (MENEZES, 2006). A variabilidade em fungos pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como, a mutação que atua criando variabilidade e os processos que ampliam a variabilidade, como o ciclo sexual, parassexualidade via anastomose entre hifas (MENEZES, 2006) e também, por meio de um tipo de célula especializada encontrada em diferentes espécies de *Colletotrichum*, denominada tubos de anastomoses entre conídios (Conidial Anastomosis Tubes - CATs) (ROCA et al., 2003).

O ciclo sexual de fungos é caracterizado, de forma geral, pela existência de em um mesmo citoplasma de núcleos haploides com constituições genéticas distintas (dicárions) que se funde em estruturas apropriadas, produzindo um núcleo diploide, que, quase imediatamente, sofre meiose, restaurando o estado haploide dos núcleos (AZEVEDO, 1998). Souza, Camargo Junior e Pinto (2010) ao estudarem a reprodução e a estrutura populacional de *C. lindemuthianum*, verificaram que, apesar de ser encontrado na forma sexual e de suas estruturas de reprodução sexuais não terem sido observadas na natureza, sua organização e diversidade genética são semelhantes a de populações originadas de reprodução sexuada do que de populações assexuadas. Portanto, é provável que ela esteja ocorrendo no campo o que explicaria a ampla variabilidade genética apresentada pela espécie.

Anastomoses de hifas permitem a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes, evento requerido nas reações de compatibilidade, início da reprodução sexual, formação de heterocários, ciclo parassexual e a distribuição de nutrientes no micélio/colônia (GLASS; JACOBSEN; SHIU, 2000). A formação de heterocários, ou seja, a presença de

núcleos distintos no mesmo citoplasma é obtida em fungos filamentosos, por meio das anastomoses entre hifas. Segundo Azevedo (1998), para o início do processo parassexual é necessária a heterocariose. Em fungos filamentosos existe o reconhecimento sexual que é controlado por locos *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, controlado pelo loco específico *het* (SAUPE, 2000). Quando duas linhagens se encontram, elas podem sofrer a fusão celular ou anastomose. Se as duas linhagens possuem o mesmo genótipo *het* ou *vic*, ocorre a heterocariose. Se elas diferirem geneticamente para o loco, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (SAUPE, 2000). Castro-Prado et al. (2007) utilizando mutantes auxotróficos de *C. lindemuthianum* pertencentes a cinco diferentes raças, confrontaram as linhagens em todas as combinações possíveis. Esses autores observaram que quatro combinações apresentaram incompatibilidade vegetativa e onze formaram prototróficos heterocários, com formação de núcleos diploides. Os heterocários originaram segregantes mitóticos espontâneos correspondentes a uma ou outra linhagem parental. Embora esses autores tenham observado algumas barreiras na formação dos heterocários, alguns segregantes foram recuperados a partir de colônias diploides.

Ishikawa, Souza e Davide (2008) analisaram treze linhagens pertencentes a uma mesma raça de *C. lindemuthianum* e observaram a formação de anastomose de hifas entre os isolados, porém ocorreram 11 grupos diferentes de compatibilidade. Barcelos, Souza e Silva (2011) utilizaram 47 isolados pertencentes a diferentes raças de *C. lindemuthianum* para a análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). Nesse estudo, observou-se a formação de 45 grupos de compatibilidade vegetativa, em que 44 isolados foram incompatíveis e em apenas uma combinação foi observada a formação do heterocário. A alta incompatibilidade entre os isolados utilizados nesse estudo pode ser explicada pela autoincompatibilidade, pois a formação de heterocários foi baixa, evidenciando a grande variabilidade existente nesta espécie. No estudo de Pinto (2012), foram usados quatro isolados da população sexual estes formaram três diferentes grupos de compatibilidade vegetativa. Os isolados UFLAG21-1 e UFLAG46-1 foram compatíveis e, portanto, pertence a um mesmo VCG, o que indica que essas linhagens possuem os mesmos genótipos para os genes que controlam a compatibilidade vegetativa. Entretanto, os resultados da análise por meio de marcadores RAPD não evidenciaram correlação entre o marcador molecular e a compatibilidade vegetativa das linhagens avaliadas.

Como visto, para ocorrer o ciclo sexual e parassexual, primeiramente deve ocorrer a compatibilidade micelial entre as linhagens. Diversos estudos têm sido realizados a fim de

observar esta compatibilidade em linhagens de *Colletotrichum* e *Glomerella*. Pinto et al. (2012) confrontando 74 linhagens de *C. lindemuthianum* duas a duas observaram que apenas 1,78% das combinações apresentaram linha de contato entre as linhagens, mas nenhuma com peritécio fértil e viável e em nenhum pareamento foi observada a compatibilidade micelial. Barcelos et al. (2014) confrontaram dois a dois, 73 linhagens de dois diferentes grupos de *Glomerella* sp. e observaram que apenas 75 pareamentos resultaram na linha de contato, 49 formaram peritécios férteis com formação de ascos e ascósporos. As linhagens que formaram eram uma conidial e a outra peritecical. Esses 49 foram repetidos e usada a membrana de diálise separando as duas linhagens e resultou que apenas 21 combinações apresentaram a linha de contato novamente, e em todas formaram no lado da colônia conidial, sugerindo que a colônia peritecical induziu a conidial. Mota et al. (2016) confrontaram 22 linhagens isoladas do feijoeiro e pertencentes a diferentes espécies de *Colletotrichum* e *Glomerella* sp. e observaram que apenas 27 combinações apresentaram compatibilidade micelial e destas apenas cinco formaram linha de contato entre as linhagens.

2.4 Anastomose entre conídios

Conidial Anastomosis Tubes (CATs) é uma hifa (protusão curta) especializada, produzida durante o início da colonização, crescem quimiotropicamente em direção à outra e fundem-se para formar uma rede de conídios interconectados (READ, GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). Através destas conexões, podem ser trocados nutrientes, água, moléculas sinalizadoras, núcleo, mitocôndrias e outras organelas (READ et al., 2009). Esse sistema foi descrito primeiramente em *C. lindemuthianum* por Roca et al. (2003) e, atualmente, já foram identificados em 73 espécies de fungos filamentosos que pertencem a 21 gêneros diferentes, e desenvolvem-se em meio de cultura e no hospedeiro (ISHIKAWA et al., 2010a; ROCA et al., 2003). Em fitopatógenos, tais como, *Botrytis cinerae* e *Fusarium oxysporum* os CATs têm sido investigados sobre os genes e substâncias que estão envolvidos na fusão e, até mesmo, na dinâmica nuclear durante a fusão (ROCA et al., 2012; RUIZ-ROLDÁN et al., 2010).

Embora muitas espécies apresentem a formação de CATs, o processo de fusão tem sido investigado detalhadamente em *Neurospora crassa* (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012) que apresenta as seguintes vantagens: o processo ocorre em 6h; há facilidade de se obter mutantes devido ao genoma sequenciado; possuir mutantes para a maioria dos genes; técnicas para visualização e também os inibidores químicos estão bem estabelecidas para os

diferentes estágios (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). Nessa espécie, foi demonstrado que os CATs apresentam controle genético diferente dos tubos germinativos (ROCA et al., 2005). O processo de fusão de CATs foi dividido nas seguintes fases: indução; quimioatração; adesão celular; remodelagem da parede celular; fusão da membrana plasmática e continuidade citoplasmática entre CATs fundidos. No entanto, são destacadas três fases do processo: a indução, a quimioatração e a fusão, que serão descritas a seguir (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012).

A indução é regulada por moléculas sinalizadoras liberadas no meio circundante, mas não se sabe a identidade e nem os receptores que se ligam e ativam esse processo (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). A evidência de um indutor extracelular de CATs surgiu da observação de que a formação de CATs é dependente da densidade conidial (ROCA et al., 2005; ISHIKAWA et al., 2010a). Um possível candidato seria um peptídeo que ainda não foi identificado, que proporcionaria uma possível especificidade às espécies que é necessária para evitar a autofusão e que poderia ativar a cascata da MAP-Kinase (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012; ROCA et al., 2005). Outros sinais externos podem influenciar como os nutrientes (GLASS; FLEISSNER, 2006; ISHIKAWA et al., 2010a) e a idade dos conídios (ISHIKAWA et al., 2010a).

Em *N. crassa*, os macroconídios crescem pela expansão isotrópica, e a polarização celular leva à formação do tubo germinativo e dos tubos de anastomoses. As células geneticamente idênticas se comunicam liberando um quimioatrativo que é percebido por conídios opostos, assim, ocorre a orientação do crescimento de acordo com o contato químico célula-a-célula. Esse mecanismo é denominado ping-pong, pois dois conídios trocam repetidamente pulsos de sinalização e compõe a fase quimioatração (READ et al., 2009; GORYACHEV et al., 2012). Duas proteínas, a MAP quinase MAK-2 e a proteína SO que contém o domínio WW, foram demonstradas exibirem recrutamento oscilatório de tal modo que, quando MAK-2 está localizada transitoriamente na ponta de um CAT a SO está localizada simultaneamente na outra ponta (FLEISSNER et al., 2009). Tem sido proposto que uma ponta atua como "sinal remetente" e a outra como "sinal receptor", em que SO enviaria o sinal e a MAK-2 receberia o sinal. Esse processo pulsátil é ativado quando os conídios em formação estão <15 µm entre si e, assim, as proteínas podem ser repetidamente recrutadas nas pontas dos CATS de 4-6 vezes durante o crescimento até a fusão. A inativação da atividade da MAK-2 causa a destruição na estabilização da membrana plasmática em ambos os parceiros, mesmo quando o tipo selvagem MAK-2 está presente no parceiro de fusão (FLEISSNER et al., 2009).

Quando as células entram em contato físico, os CATs se aderem uns aos outros, envolvendo, provavelmente, uma secreção de compostos adesivos (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). Após a aderência, ocorre a formação de poros de fusão, que inclui a degradação da parede celular localizada na região de contato bem como a remodelagem da parede celular. Ocorrem também à fusão da membrana citoplasmática, organelas, incluindo os núcleos, que se misturam entre os macroconídios fundidos (READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). Algumas proteínas localizadas no poro de fusão são MAK-2 (FLEISSNER; DIAMOND; GLASS, 2009), as proteínas polarisoma BNI-1, BUD-6 e SPA-2 (LICHIOUS et al., 2012) e F-actina (BEREPIKI et al., 2010; ROCA et al., 2010; LICHIOUS; BEREPIKI; READ, 2011), desempenhando papel na formação dos poros. No entanto, apenas a proteína de membrana PRM-1 é conhecida atuar após o contato dos conídios e na quebra da parede celular (WEICHERT; FLEISSNER, 2015). A função dessa proteína foi descrita primeiramente em levedura, na qual de cerca de 50% dos mutantes Δ prn-1 não fundiram. Análises por meio da microscopia eletrônicas revelaram que ocorre a degradação da parede celular, no entanto não ocorre a fusão da membrana (HEIMAN; WALTER, 2000). Em *N. crassa*, um fenótipo comparável durante a fusão foi observado, sugerindo que PRM-1 faz parte da fusão da membrana também nessa espécie (FLEISSNER; DIAMOND, GLASS, 2009).

Resultados prévios em *N. crassa* indicam que respostas de incompatibilidade que levam à morte celular são suprimidas em estágios iniciais do estabelecimento da colônia. Portanto, a fusão de CATs durante esse período, pode proporcionar uma oportunidade da recombinação não meiótica (READ; ROCA, 2006). Segundo esses autores, isso pode explicar a grande variabilidade genética em espécies em que a reprodução sexual não ocorre ou é raramente encontrada na natureza. Roca et al. (2005) sugerem que os CATs podem ser importantes para incrementar as chances de estabelecimento da colônia e/ou para transferência de genes, e suas funções precisam ser rigorosamente analisadas, experimentalmente. Conídios unidos por CATs foram encontrados germinando mais rapidamente do que conídios individuais (ROCA et al., 2003). A formação de CATs ocorre durante o ciclo assexual, dando a oportunidade para diferentes genótipos da espécie encontrarem-se em um complexo comum (complexo formado pelas anastomoses). Esse fato pode levar ao surgimento de fenótipos diferentes, com base em outros preexistentes (ROCA et al., 2004, ISHIKAWA et al., 2012).

2.5 CATs em *Colletotrichum* do feijoeiro

A formação dos CATs foi primeiramente descrita em *C. lindemuthianum* por Roca et al. (2003) que caracterizaram esse fenômeno baseado na visualização nessa espécie. Os CATs aparecem nessa espécie cerca de 15 dias após o início do desenvolvimento do corpo de frutificação assexual, e a quantidade de conídios em anastomoses aumenta com o tempo. Esses autores identificaram algumas evidências que demonstram que essas estruturas são hifas especializadas e adaptativas. Os CATs não são o resultado da separação incompleta durante a conidiogênese, pois: (i) é possível ver uma protuberância no ponto de fusão de CATs, (ii) a localização dos tubos é, geralmente, lateral podendo ser também na ponta dos conídios (iii) múltiplas conexões são formadas, e (iv) CATs começam a aparecer quando a conidiogênese está praticamente completa. Outra evidência é que a forma dos CATs difere dos tubos germinativos, uma vez que: (i) o diâmetro médio do CAT é 2µm em comparação com > 4 µm dos tubos germinativos, (ii) CATs nunca desenvolvem-se em hifas após serem colocados em meio nutritivo, (iii) CATs unem conídios, enquanto os tubos germinativos têm apenas um conídio em uma extremidade, (iv) estruturas de dimensões dos tubos germinativos nunca foram vistas emergindo de conídios dentro de corpos de frutificação, e (v) CATs não são inibidos pela mucilagem acervular que inibe a germinação convencional. Esses autores também observaram a passagem de mitocôndrias, núcleos e outras organelas entre os conídios em fusão.

CATs entre conídios de diferentes espécies de *Colletotrichum* ocorreram quando estes foram misturados in vitro (ROCA et al., 2004). Duas espécies de *Colletotrichum* foram combinadas, utilizando marcadores morfológicos e genéticos (cor, forma e tamanho de esporos, características culturais, e um marcador de PCR para o gene de resistência à higromicina) para detectar a progênie híbrida. Uma co-inoculação de alta densidade foi feita com conídios de um isolado resistente à higromicina de *C. lindemuthianum* e um isolado sensível à higromicina de *C. gossypii*. Os híbridos apresentaram propriedades intermediárias entre as linhagens parentais, quando cultivados em meio com higromicina, como esporos, que obtiveram tamanho intermediários aos dois parentais. A taxa de germinação do "híbrido" foi menor do que a do parental resistente à higromicina da qual veio, sugerindo que o processo é raro e/ou de baixa eficiência. Esses dados sugerem, fortemente, que as colônias continham núcleos recombinantes que eram de parentesco misto e que a composição genética foi, pelo menos, semiestável (ROCA et al., 2004).

Ishikawa et al. (2010a) estabeleceram um protocolo para observação de CATs, no qual todo o processo de fusão de CATs em *C. lindemuthianum* pode ser melhor observado após a incubação dos conídios em água por 48 h. Após 72 h, o processo é mais difícil de ser observado, devido à vacuolização aumentada das células envolvidas. Dois tipos de fusão de CATs podem ser observados: (a) da ponta do conídio para a lateral de um conídio ou possivelmente uma ligeira saliência do lado de um conídio, e (b) da ponta de um conídio à ponta do outro. Todo o processo de fusão de CATs é realizado em 12 horas ou mais e o máximo de fusão de conídios encontrado foi de 25,8%.

O comportamento nuclear durante a fusão de CATs em *C. lindemuthianum* foi observado em análises *in vitro* utilizando isolados transformados com proteínas fluorescentes vermelha e verde respectivamente por Ishikawa et al. (2012). A incompatibilidade do heterocáριο foi observada entre as colônias de linhagens vegetativamente incompatíveis, resultando em morte celular. No entanto, a fusão de CATs entre conídios uninucleados desses isolados incompatíveis não causou a reação de incompatibilidade. Os núcleos vermelhos e verdes da combinação desses isolados mostraram migrar de um conídio para outro, formando o heterocáριο e, posteriormente, ocorreu a mitose. A formação de núcleos amarelos resultantes dessa combinação após a fusão foi observada em 27% dos heterocários formados. Os autores propuseram duas hipóteses para explicar a formação dos núcleos amarelos: i) os núcleos são formados pela mistura das proteínas fluorescentes; ii) são formados pela fusão dos núcleos verde e vermelho. Nesse mesmo trabalho, os autores confirmaram que a formação de heterocários como consequência da fusão de CATs pode gerar isolados com fenótipos distintos, provavelmente devido à geração de novos genótipos. A partir de testes de patogenicidade, comprovou-se a ocorrência de raças diferentes das linhagens de *C. lindemuthianum* avaliadas. Portanto, a fusão de CATs é um mecanismo potencial de recombinação não meiótica nessa espécie, gerando variabilidade por meio da transferência horizontal de genes.

Ishikawa et al. (2013) estudaram a organização nuclear e a mitose de *C. lindemuthianum* durante a formação de CATs. Esses autores observaram que a mitose não foi essencial para a formação do tubo germinativo e formação de CATs ou fusão. Os núcleos nos conídios fundidos em CATs exibiram mitoses assíncronicas e a migração nuclear ocorreu após os núcleos terem sido divididos. Diferentes padrões de divisão nuclear foram encontrados em hifas vegetativas da colônia madura. Diferentes padrões de mitose foram observados nos diferentes compartimentos das hifas, e os padrões síncronicos, parasíncronicos e assíncronicos foram observados em compartimentos de hifas apicais,

enquanto apenas mitoses sincrônicas e assincrônicas ocorreram em compartimentos de hifas subapicais.

Em condições naturais, sobre a superfície do hospedeiro, a formação de CATs também tem sido observada (ISHIKAWA et al., 2010b). Estes autores observaram a formação de CATs na superfície de folhas após 48 e 72h da inoculação de *C. lindemuthianum* por meio da microscopia eletrônica de varredura. Além disso, nas espécies de *Colletotrichum* da macieira, vem sendo observado a ocorrência de CATs na superfície das folhas (ARAÚJO; STADINIK, 2013; GONÇALVES; VELHO; STADINIK, 2016).

A taxa de formação de CATs em linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. têm sido avaliada em algumas oportunidades. Pinto et al. (2012), avaliando uma população de 74 isolados de *C. lindemuthianum*, observaram ampla variabilidade na formação de CATs, sa linhagem que apresentou a maior porcentagem de fusão foi de 60% e apenas quatro linhagens não formaram CATs. Os resultados indicam que a fusão de tubos de anastomoses entre conídios foi frequente nessa população, indicando que a recombinação assexual pode estar auxiliando na geração de variabilidade dessa espécie. Barcelos et al. (2014) avaliaram a formação de CATs numa população de *Glomerella* spp. isoladas do feijoeiro de 73 linhagens oriunda de lesões de antracnose e obtidos a partir de ascósporos. Das 53 linhagens conidiais, 51 formaram CATs em porcentagens variáveis (0,75 à 78,75). No entanto, não foi observada a formação de CATs nas linhagens periteciais. Assim, as autoras concluíram que as progênies sexuais e assexuais possuem habilidades diferentes de recombinação, ou seja, as assexuais poderiam utilizar os CATs para gerar recombinação. Mota et al. (2016) estudaram 22 linhagens pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, sendo 16 monosascospóricos e seis monospóricos, provenientes de lesões de sarna e antracnose do feijoeiro. Dessas linhagens, apenas três não formaram CATs, duas linhagens produziram ascósporos e uma linhagem cujo conídio era falciforme. Além disso, quatro linhagens apresentaram porcentagens de formação de CATs superior a 50%, semelhante aos valores encontrados na literatura para *C. lindemuthianum* por Pinto et al. (2012). Dessas quatro linhagens, duas não produziram sintomas no feijoeiro comum e as outras duas produziram sintomas típicos da sarna e da antracnose quando inoculados no feijoeiro comum e na soja, respectivamente.

2.6 Proteína SO (SOFT)

A proteína SOFT (SO) é conservada nos fungos filamentosos pertencentes aos Ascomycetos e é essencial para a comunicação celular na formação de CATs em *N. crassa* (FLEISSNER et al., 2005). A proteína possui um domínio WW (562 a 594 aa), que é caracterizado por dois triptofanos conservados (W) espaçados 20 a 22 aminoácidos de distância (ANDRÉ; SPRINGAEL, 1994; MACIAS; WISNER; SUDOL, 2002). Esse domínio tem sido descrito mediando às interações proteína-proteína por reconhecimento do aminoácido prolina. Em outros sistemas, as proteínas que possuem esse domínio têm sido correlacionadas com sinalização para membrana-citoesqueleto (ISLEY; SUDOL; WINDER, 2002). A proteína está localizada no citoplasma e quando recrutada na comunicação celular, se acumula na membrana plasmática formando complexos de 300nm (FLEISSNER et al., 2009).

A perda da função do gene *so* em *N. crassa* resulta em fenótipos pleiotrópicos incluindo redução de hifa aérea, alteração na conidiação e esterilidade da fêmea na reprodução sexual. Além disso, impedem a formação de anastomoses entre hifas ou conídios (FLEISSNER et al., 2005). Além de mediar a fusão, esse gene parece como função também na manutenção da integridade das hifas, pois acumula fortemente nos septos, impedindo a perda de citoplasma, o envelhecimento e a morte das hifas (FLEISSNER; GLASS, 2007). A função de formação de anastomoses parece ser conservada em fungos de diferentes estilos de vida, incluindo o fungo saprófita *Sordaria macrospora*, as espécies fitopatogênicas *Alternaria brassicola* e *Fusarium oxysporum*, e o endófito mutualista *Epichlōe festucae* (CHARLTON et al., 2012; CRAVEN et al., 2008; ENGH et al., 2007; PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008). Em *A. brassicola*, além de impedir a formação de anastomoses entre hifas, a proteína está localizada no septo dentro dos micélios que estão submetidos a mudanças de desenvolvimento associado com estruturas sexuais ou em resposta à morte celular programada. Nas espécies *E. festucae* e *F. oxysporum*, também se observou a redução da hifa aérea, assim como em *N. crassa*. No entanto, não houve diferença na formação de conídios nessas espécies e também em *A. brassicola*, como ocorreu em *N. crassa* (CHARLTON et al., 2012; CRAVEN et al., 2008; PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008). Em *S. macrospora* o gene é essencial para o desenvolvimento do corpo de frutificação, também acumulado nos septos das hifas e co-localizado com a proteína HEX-1 (ENGH et al., 2007). No entanto, não está claro como a localização subcelular da proteína SO refere-se ao seu papel na fusão de hifas vegetativas e sexuais.

Curiosamente, o gene *so* parece estar envolvido em interações fungo-hospedeiro. Em *A. alternata*, o gene é essencial para a patogênese, assim como para *A. brassicola*, em que o

mutante foi incapaz de se espalhar a partir do local da inoculação em couve (CRAVEN et al., 2008). Já em *E. festucae*, o silenciamento do gene resultou na patogenicidade, indicando um papel essencial do gene no estabelecimento e/ou manutenção da interação simbiótica da espécie (CHARLTON et al., 2012). Em contraste, a patogenicidade de *F. oxysporum* não foi significativamente afetada, mesmo perdendo a capacidade de colonizar eficientemente a raiz do tomateiro (PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008). Esses resultados sugerem que a extensão a que anastomose contribui para a patogenicidade pode depender da espécie e das estratégias de infecção dos fitopatógenos (READ et al., 2009). Embora a função molecular da proteína SO seja ainda desconhecida, Goryachev et al. (2012) sugeriram um modelo em que esta proteína pode estar envolvida na fase de liberação do sinal quando a taxa do ativador decresce, com formação de vesículas na região apical da membrana plasmática dos conídios em formação de CATs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização das linhagens

As espécies *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* sp. utilizados neste estudo foram preservados pelo método do papel e pertencem a micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a doenças localizado no Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (Tabela 1), Brasil. As linhagens foram isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro e foram crescidas e mantidas em Batata Dextrose Agar (BDA). Para estimular a esporulação, foi utilizado o mesmo meio de cultura. A patogenicidade dessas linhagens foi previamente estudada por Mota et al. (2016).

Tabela 1 Espécies pertencentes das linhagens utilizadas no estudo, doença causada no feijoeiro e o tipo de esporo que foi isolado.

Linhagem	Espécie	Doença no feijoeiro	Esporo isolado
LV134	<i>C. lindemuthianum</i>	Antracnose	Conídio
G7-2	<i>Glomerella</i> spp. I	Não patogênica	Ascósporo

3.1.1 Caracterização citológica

As suspensões de conídios ($1,2 \times 10^6$ conídios/mL) foram obtidas por meio da adição de 7 ml de água estéril na placa de Petri, filtradas com Miracloth e ajustada à concentração.

Foram observados conídios não germinados e germinados, após incubação a 24h e 23°C. Para a observação dos núcleos e das mitocôndrias, diferentes fluorocromos foram usados, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 Concentração, seletividade e excitação/emissão de comprimento de onda (nm) para cada corante fluorescente.

Corante Fluorescente	Concentração usada	Seletividade	Excitação/Emissão comprimento de onda (nm)
DAPI	30 µM	Núcleo	358/461
Rhod B	1 µM	Mitocôndria	555/578

3.1.2 Compatibilidade sexual e micelial

Discos de micélio das duas linhagens foram pareados em placas contendo meio BDA. Discos de micélios de 6 mm de diâmetro foram colocados 2 cm entre si, com duas repetições por confronto. As placas foram avaliadas, após 15 dias de incubação no escuro a 22°C. A compatibilidade sexual foi indicada pela formação de peritécios na linha de contato entre as colônias. A compatibilidade micelial foi caracterizada pela mistura do micélio na zona de contato entre duas colônias.

Esporos das duas linhagens foram co-cultivados em meio BDA por 15 dias. As placas foram avaliadas em microscópio para observar a presença de estruturas sexuais.

3.1.3 Caracterização da formação de CATs

As linhagens foram previamente avaliadas para observar a porcentagem de fusão de CATs por Mota et al. (2016). No entanto, um experimento em DIC foi conduzido em esquema fatorial, com duas linhagens e três temperaturas e com parcela subdividida no tempo com duas repetições a fim de avaliar a influência da temperatura na formação dos CATs. As suspensões de conídios ($1,2 \times 10^6$ conídios/mL) foram obtidos como descrito anteriormente e 200 µL de cada suspensão foi colocada numa câmara de cultura de cultivo de 8 células (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubadas a 20, 22 e 24°C no escuro. As imagens foram avaliadas por microscopia de luz utilizando objetiva de 100x. A fusão de CATs foi quantificada como a porcentagem de conídios ou conídios envolvidos em fusões (ISHIKAWA et al., 2010a).

3.2 Clonagem dos genes *clso* e *glso* e estudo da comunicação e fusão celular

3.2.1 Clonagem do gene *clso* e *glso*

DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificado pela metodologia de Kaufman, Richards e Dierig (1999). Como essas espécies não possuíam genoma sequenciado, foram utilizados primers de duas outras espécies do gênero para a amplificação do gene *clso* e *glso*. DNA polimerase Phusion (Finnzymes, distribuído pela New England Biolabs) foi utilizada para amplificar fragmentos de expressão para os primers derivados de *C. graminicola*. Após localização dos genes, novos primers foram utilizados com acréscimo da sequência de corte das enzimas de restrição, a fim de serem clonadas em plasmídeos. Foram utilizadas as enzimas GRAFBamI e GRARPacI para a linhagem LV134 e GRAFXbaI e GRARPacI para a linhagem G7-2 (Tabela 3). O ciclo de amplificação consistiu de uma desnaturação a 98°C durante 30s, seguido de 34 ciclos consistindo em 30s a 98°C, 20s a 58°C e 4min a 72°C. Os produtos de PCR foram clonados no plasmídeo pMF272 e sequenciados.

As sequências das linhagens foram comparadas entre si por Cluster W e também com outras linhagens de outras espécies de fungos filamentosos e também com outras espécies do gênero *Colletotrichum*, incluindo duas linhagens de *C. lindemuthianum* que possuem genoma sequenciado. Após a comparação das identidades gênicas, foi realizado um dendograma circular pelo método UPGMA utilizando Cluster W.

Tabela 3 Primers usados para a amplificação dos genes *clso* e *glso* e clonagem do gene no plasmídeo.

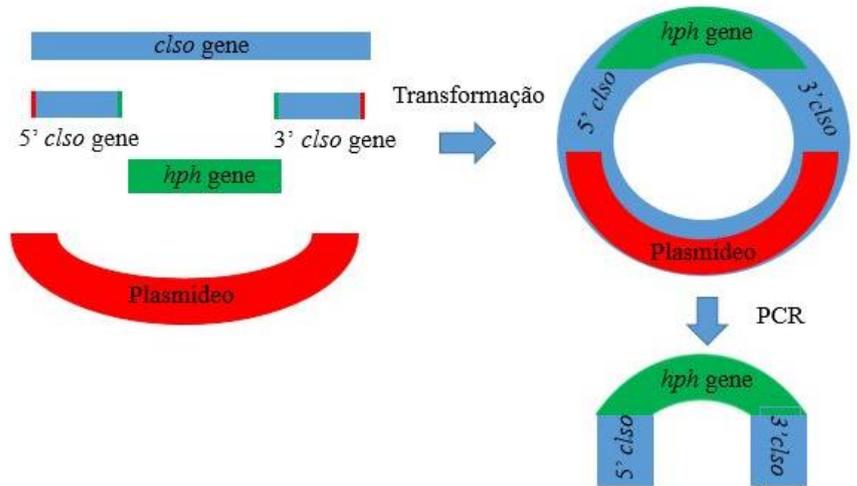
Primers	Sequence
GRA F XbaI	5' AATGTATCTAGAATGGAGCGCAGTCGCGGTGTC 3'
GRA R PacI	5' AATGTATTAATTAACCGACCAAACCTCCAGGTG 3'
GRA F BamI	5' AATGTAGGATCCATGGAGCGCAGTCGCGGTGTCC3'

3.2.2 Preparação do cassete para inativação gênica

A técnica de recombinação e clonagem por leveduras foi usada para obter os mutantes segundo o protocolo descrito por Gietz e Schiestl (2007). Para isso, foi amplificado por PCR 1kb da região 5' do gene *clso* e do gene *glso* utilizando primer *forward* com sequência do plasmídeo de levedura e o *reverse* com a sequência do gene *hph*. Também foi amplificado 1kb da região 3' dos mesmos genes utilizando-se o primer *forward* com sequência do gene *hph* e o *reverse* com sequência do plasmídeo de levedura. O gene *hph* também foi amplificado

por PCR. Os fragmentos foram incubados junto ao plasmídeo cortado da levedura para ocorrer a recombinação e posteriormente, a levedura foi transformada. Após o crescimento da levedura transformada, o plasmídeo foi extraído e o cassete foi amplificado por PCR para realizar as transformações genéticas das linhagens (Figura 1).

Figura 1 Esquema da técnica de recombinação e clonagem por leveduras para o gene *clso*.



3.2.3 Construção do plasmídeo de restauração

Para fundir o gene *clso* e gene *glso* ao gene da proteína fluorescente GFP, os genes das linhagens foram amplificados por PCR com primers da tabela 3 modificados, ou seja, sem o códon de parada. Os fragmentos foram clonados no plasmídeo pMF272, antes do gene *gfp*, de maneira a formar uma sequência, *clso+gfp* e *glso+gfp*. O plasmídeo possui o promotor de *N. crassa ccg-1* e o gene *hph* para conferir resistência à higromicina (HPH). Esse plasmídeo foi utilizado para a restauração dos genes nas colônias que foram obtidas com o gene inativado.

3.2.4 Transformação genética das linhagens

Os conídios foram obtidos de culturas com 10-15 dias, depois foram lavados duas vezes em água e inoculados em 100 mL de meio Batata-dextrose. Os protoplastos foram obtidos por metodologia previamente descrita por Ishikawa et al. (2010c). Para a transformação genética, foi utilizada metodologia modificada descrita por Ishikawa et al. (2012). Resumidamente, os protoplastos foram suspensos em STC (1,2 M de sorbitol, 10

mM de Tris-HCl e 50 mM de CaCl₂, pH 7,5) a uma concentração de 10⁷ protoplastos/mL. 100 µL de protoplastos foram adicionados junto a 3-5 mg de DNA plasmidial em um tubo de polipropileno de 50 ml. A mistura foi incubada em gelo durante 20 min e depois 1 mL de PEG (40% PEG 3350, 50% de PEG 6000, 0,6 M de KCl, CaCl₂ 50 mM e Tris-HCl a 50, pH 8,0) foi adicionado e a mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 20 min. Foi adicionado 40 mL de meio de regeneração (1 M de sacarose, 1,25% de hidrolisado de caseína, 1,25% de extrato de levedura, 1,0% de ágar, pH 8,0 40 ml). Após 3 dias a 22°C, BDA e o antibiótico Higromicina (100 mg/ml) foram adicionados nas placas de transformação, selecionando as colônias com base na resistência ao antibiótico.

Após o crescimento das colônias, foram obtidas culturas monospóricas para cada transformação realizada, ou seja, para a inativação do gene *clso* e *glso* e também para restauração do mesmo gene. O DNA das colônias obtidas foi extraído e realizadas PCR's para observar a substituição gênica. Para a inativação gênica, foi observada a presença do cassete de transformação, presença do gene *hph* e também, na ausência dos genes *clso* e *glso*. Para a restauração não foi preciso realizar a PCR, uma vez que foram selecionadas as colônias que expressaram GFP.

3.2.5 Estudo da comunicação e formação de CATs

Neste experimento, o tempo para ocorrer a comunicação e a fusão dos CATs foi avaliado. Os conídios foram obtidos a partir de culturas de 13-17 dias crescido em BDA e obtida a suspensão de esporos em água na concentração 1,2 x 10⁶ conídios/mL. 200 µL da suspensão de conídios foram adicionados em câmaras de cultivos de oito células e incubados a 22°C por 48h. Após a incubação, as câmaras foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido e as imagens foram obtidas a cada 10 min. Foi utilizado o Microscópio Zeiss Observer 2.1 com óptica Nomarski com uma objetiva de óleo de imersão Plan-Neofluar 100x/1.30 (420493-9900) com LED (CoolLED pE4000) como fonte de luz para microscopia de fluorescência. As imagens foram capturadas com um PCO Edge 5.5 Gold (16 Bits) sob controle de um software programado em C++ da Zeiss. As imagens foram obtidas com um incremento de 10 nm, usando o software Huygens deconvolution (Scientific Volume Imaging (SVI)), utilizando configurações padrões no modo clássico e até 100 iterações.

3.3 Avaliação da inativação do gene *clso* na formação dos CATs

Neste experimento, foram utilizadas as linhagens, os mutantes para o gene *clso* e *glso* ($\Delta clso$ e $\Delta glso$) e as complementações do gene para cada linhagem (*clso+gfp* e *glso+gfp*). Um experimento em DIC foi conduzido em esquema de parcela subdividida no tempo com duas repetições. Para isso, 200 μ L de suspensão de conídios em 10^6 esporos/mL de cada suspensão foram colocadas numa câmara de cultura de cultivo de oito poços (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubadas a 22° C. Após 24 e 48 horas a 22°C no escuro, foram avaliados 100 conídios por repetição utilizando microscópio de luz Zeiss axio Observador Z1 e objetiva de 63x. as imagens do microscópio foram capturadas por meio do software Axio vision Zeiss e processadas pelo software Image J.

3.4 Caracterização das linhagens transformadas

3.4.1 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial

Para a avaliação do IVCM e do diâmetro colonial, foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. A parcela foi constituída por uma placa de Petri. Discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio BDA e incubadas no escuro à 22°C. O IVCM foi avaliado por meio da leitura das médias (em milímetros) entre os dois diâmetros ortogonais da colônia em intervalos de 24 horas, durante 10 dias, e estimado utilizando-se a expressão $IVCM = \sum(Dc - Dp) / N$, em que Dc é a média atual do diâmetro colonial, Dp é a média do anterior do diâmetro colonial e N é o número de dias após a inoculação (OLIVEIRA, 1991). O diâmetro colonial foi determinado medindo-se os diâmetros ortogonais das colônias (em milímetros), após 10 dias de incubação.

3.4.2 Taxa de esporulação e Porcentagem de Germinação

Para a avaliação da capacidade de esporulação, o experimento em DIC foi conduzido com duas repetições. Em placas de Petri com meio BDA as linhagens foram inoculadas e incubadas à 22°C por um período de 15 dias no escuro. Cada parcela foi constituída por uma placa. Foram obtidas suspensões de conídios adicionando 7 mL de água estéril nas placas de

Petri inoculadas e filtrando-se a suspensão com Miracloth. Uma alíquota (10 µL) foi retirada de cada suspensão original e realizou-se a leitura da concentração de conídios.

Para a avaliação da porcentagem de germinação, suspensões de conídios na concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios/mL foram obtidas como descrito anteriormente, a partir de placas contendo BDA com 15 dias de incubação. 200 µl das suspensões de conídios foram gotejados em uma lâmina de cultivo (Nalge Nunc International, Rochester, NY) e incubados a 22°C. Um experimento em DIC foi conduzido em esquema de parcela subdividida no tempo com duas repetições. Após 24 e 48 horas a 22°C no escuro, foram avaliados 100 conídios por repetição, foram avaliados por meio de microscopia de luz, descrito no item anterior 3.3. Os conídios que apresentaram tubo germinativo de tamanho igual ou maior do que o menor diâmetro do conídio foram considerados germinados

3.4.3 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado a partir da inoculação das linhagens selvagens, com os genes inativados e com os genes restaurados em três cultivares de feijão, Majestoso, Pérola e Ouro Negro. As linhagens foram crescidas em placas de Petri com BDA por 15 dias a 22°C. A suspensão de esporos foi obtida por meio da raspagem das placas com água destilada estéril e filtradas com Miracloth e ajustadas à concentração de $1,2 \times 10^6$ esporos/mL. Foi conduzido um experimento para cada linhagem em DIC com três tratamentos e duas repetições. Cada parcela foi constituída por nove plantas. As cultivares foram semeadas em bandejas contendo substrato Verde Campo®. As plântulas foram inoculadas, de acordo com a metodologia descrita por Pinto et al. (2012). A severidade da doença foi avaliada ,10 dias após a inoculação ,por meio da escala de notas proposta por Schoonhoven e Pastor Corrales (1987). A escala varia de 1 a 9, a nota 1 ausência de sintomas; a nota 2 até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas; nota 3 maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; a nota 4 até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces das folhas; a nota 5 maior frequência dos sintomas foliares descrita no grau anterior, até 3% das nervuras afetadas; a nota 6 manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces das folhas, e presença de algumas lesões em talos, ramos e pecíolos; a nota 7 manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido mesofílico adjacente que se rompe. Presença de abundantes lesões no talo, ramos e pecíolos; a nota 8

manchas necróticas em quase todas as nervuras, muito abundante em talos, ramos e pecíolos, ocasionando rupturas, desfolhação e redução do crescimento das plantas e a nota 9 a maioria das plantas mortas.

3.5 Formação de CATs entre as espécies

Experimento foi realizado utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. 100 µL de suspensão de conídios da linhagem LV134 e 100 µL da suspensão de conídios da linhagem G7-2 transformada com GLSO+GFP, ambos na concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios/mL, foram misturados nas câmaras e incubados a 22°C por 48h. As amostras foram observadas no microscópio de fluorescência e a fusão CATs dentro e entre as espécies foram quantificadas como a porcentagem de conídios envolvidos nas fusões. O microscópio de fluorescência utilizado bem como o processamento da imagem obtida foi descrito no item 3.2.5.

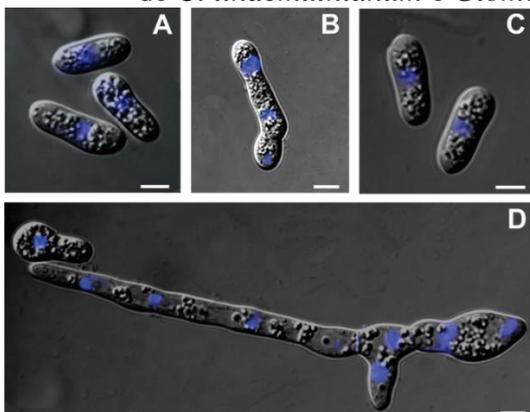
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp.

4.1.1 Caracterização citológica

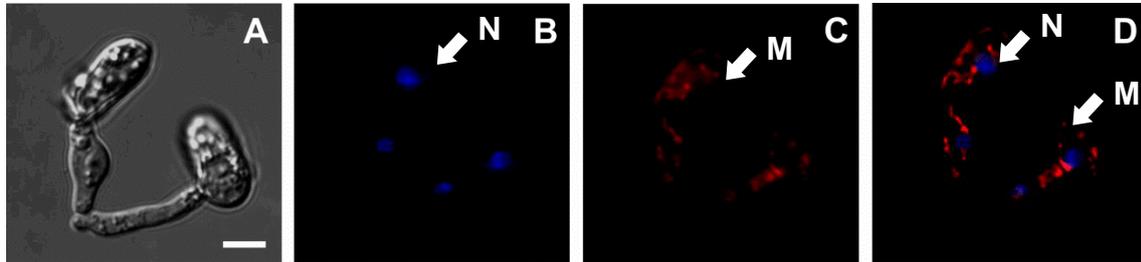
Todos os conídios observados em ambas as linhagens foram uninucleados antes e após a germinação e a formação de CATs (Figura 2). As mitocôndrias foram observadas principalmente na periferia dos conídios. Na formação dos CATs, além de estarem localizadas na periferia, também foram observadas ao redor dos núcleos (Figura 3).

Figura 2 Conídios uninucleados antes (A e C) e depois da germinação (B e D) na linhagem de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. usando DAPI



Legenda: A e B. Linhagem LV134 e C e D. Linhagem G7-2. As linhagens foram observadas com DIC e microscopia de fluorescência. Barra: 5 μ m.

Figura 3 Observação de núcleos e mitocôndrias durante a formação de CATs na linhagem LV134 de *C. lindemuthianum*.

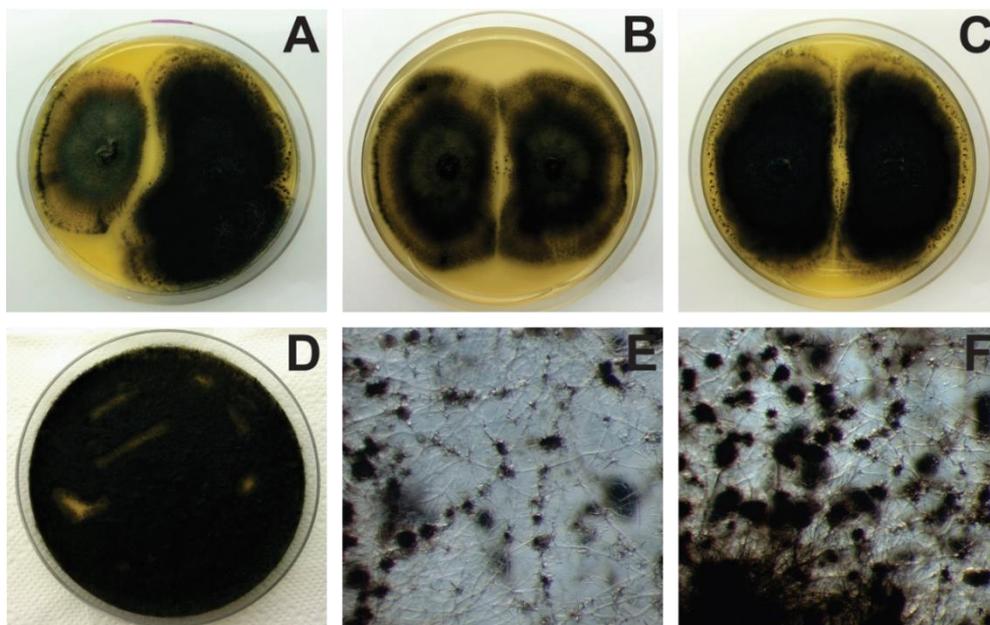


Legenda: A. DIC. B. Observação do núcleo usando DAPI. C. Observação da mitocôndria usando RhodB. D. Sobreposição entre DAPI e RhodB. N indica os núcleos em azul e M indica as mitocôndrias em vermelho. Barra: 5 μ m.

4.1.2 Compatibilidade sexual e micelial

Quando as linhagens foram confrontadas em BDA, não foram observadas linhas de contato entre ambas as linhagens, portanto, ocorre incompatibilidade e também, autoincompatibilidade (Figura 4). Quando os esporos de ambas as linhagens foram misturados, não foram visualizadas estruturas sexuais.

Figura 4 Incompatibilidade micelial e sexual entre e dentro das linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp.



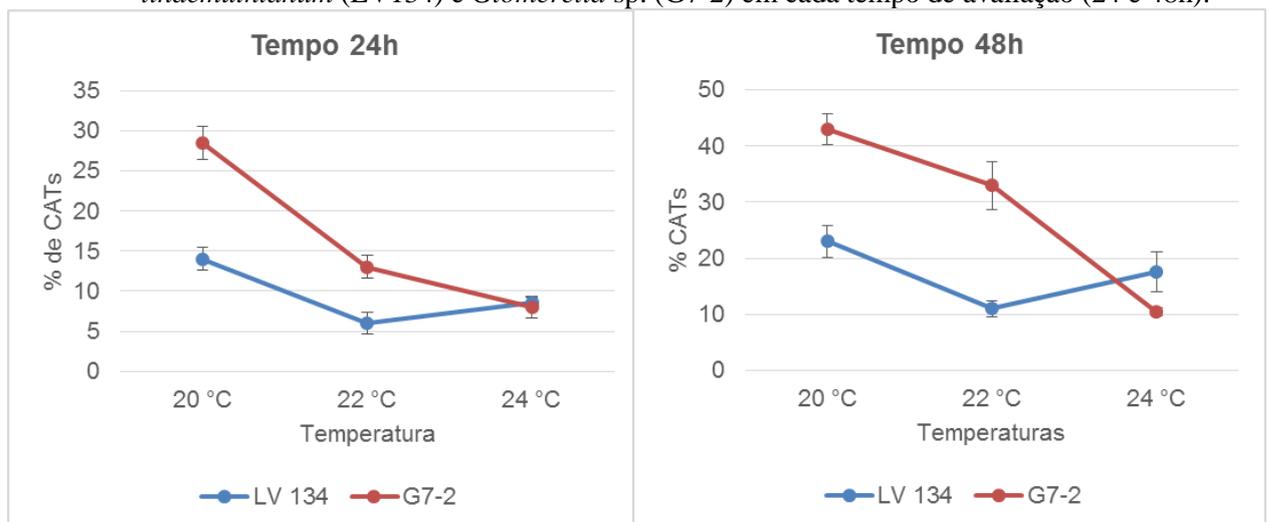
Legenda: A Pareamento entre as linhagens LV134 e G7-2. B. Pareamento da linhagem LV134 com ela mesma. C. Pareamento da linhagem G7-2 com ela mesma; D. Placa com esporo misturados das linhagens LV134 e G7-2. E e F. Mistura de esporo entre as linhagens LV134 e G7-2 observadas com microscópio estereoscópio- não foi observada estrutura sexual.

4.1.3 Caracterização da formação de CATs

A formação de CATs foi previamente avaliada por Mota et al. (2016) e as linhagens apresentou porcentagens diferentes. Na linhagem LV134, após 48 horas, 25,8% dos conídios estavam envolvidos na fusão de CATs, tanto dois a dois quanto em cadeias e, em contraste, no mesmo período de tempo, na linhagem G7-2, 79% dos conídios foram envolvidos em fusão. Septos foram observados em conídios fundidos em ambas as linhagens, no entanto, nem todos os conídios fundidos possuíam septos.

Na avaliação da melhor temperatura e do tempo para a formação dos CATs, todos os fatores foram significativos, com exceção das interações Linhagens x Tempo e Tempo X Temperatura, as duas linhagens diferiram na formação de CATs, assim como a maior porcentagem de formação de CATs foi observada às 48h. Quanto à melhor temperatura, formaram-se três grupos no teste Skott-Knott, ou seja, cada temperatura foi estatisticamente diferente da outra. Portanto, a melhor temperatura foi 20°C, seguida por 22 e 24°C. Na interação Linhagens x Tempo x Temperatura, foi possível observar pelo Gráfico 1 que a melhor temperatura para a formação dos CATs foi a 20°C para ambas as linhagens. No entanto, observa-se que a formação de CATs decresceu com o aumento da temperatura na linhagem G7-2 mas, para a linhagem LV-134 houve decréscimo a 22° C e acréscimo a 24°C (Gráfico 1)

Gráfico 1 Porcentagem da formação de CATs em três diferentes temperaturas para as linhagens de *C. lindemuthianum* (LV134) e *Glomerella* sp. (G7-2) em cada tempo de avaliação (24 e 48h).



4.2 Clonagem dos genes *clso* e *glso* e estudo da comunicação e fusão celular

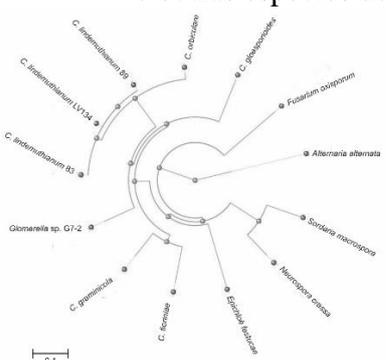
4.2.1 Identidade molecular do gene *clso* e *glso*

O gene *clso* possui 3825 e o gene *glso* possui 3791pb nas linhagens LV134 e G7-2, respectivamente. Ambas as linhagens apresentaram o domínio WW que está localizado no intervalo de 1507-1602pb e de 1477-1572pb para as linhagens LV134 e G7-2, respectivamente. Esse domínio é caracterizado por dois aminoácidos de triptofano conservados (W) espaçadas de 20 a 22 aminoácidos (FLEISSNER et al., 2005). A similaridade do gene sequenciado foi realizada entre as duas espécies estudadas (78,26%), as demais espécies de *Colletotrichum* e também, entre espécies de outros fungos filamentosos (Tabela 4). A porcentagem de identidade gênica variou de 41,57 (*Alternaria alternata*) a 99,79% (*C. lindemuthianum* 83 e 89). Dendograma de identidade genética entre essas espécies foi obtido (Figura 5), as linhagens de *C. lindemuthianum* foram idênticas e formaram um grupo irmão com *C. orbiculare*.

Tabela 4 Porcentagem de identidade da sequência do gene *so* entre as linhagens das espécies estudadas com outras espécies de fungos filamentosos.

Espécies	<i>C. lindemuthianum</i> (LV134)	<i>Glomerella</i> sp. (G7-2)	Tamanho do gene
<i>Glomerella</i> sp. G7-2	78,26 %	-	3791pb
<i>C. graminicola</i>	67,35 %	67,33 %	3731 pb
<i>C. gloeosporioides</i>	71,47 %	72,62 %	3726 pb
<i>C. fioriniae</i>	71,88 %	66,46 %	3787 pb
<i>C. lindemuthianum</i> 83	99,79 %	74,18 %	3826 pb
<i>C. lindemuthianum</i> 89	99,79 %	74,18 %	3826 pb
<i>C. orbiculare</i>	93,10 %	71,41 %	3839 pb
<i>Alternaria brassicola</i>	41,57 %	42,52 %	3535 pb
<i>Epichloë festucae</i>	51,53 %	51,07 %	3910 pb
<i>Fusarium oxysporum</i>	48,03 %	50,80 %	6240 pb
<i>Sordaria macrospora</i>	45,78 %	46,53 %	4011 pb
<i>N. crassa</i>	47,35 %	48,88 %	3990 pb
Tamanho de gene	3825 pb	3791 pb	

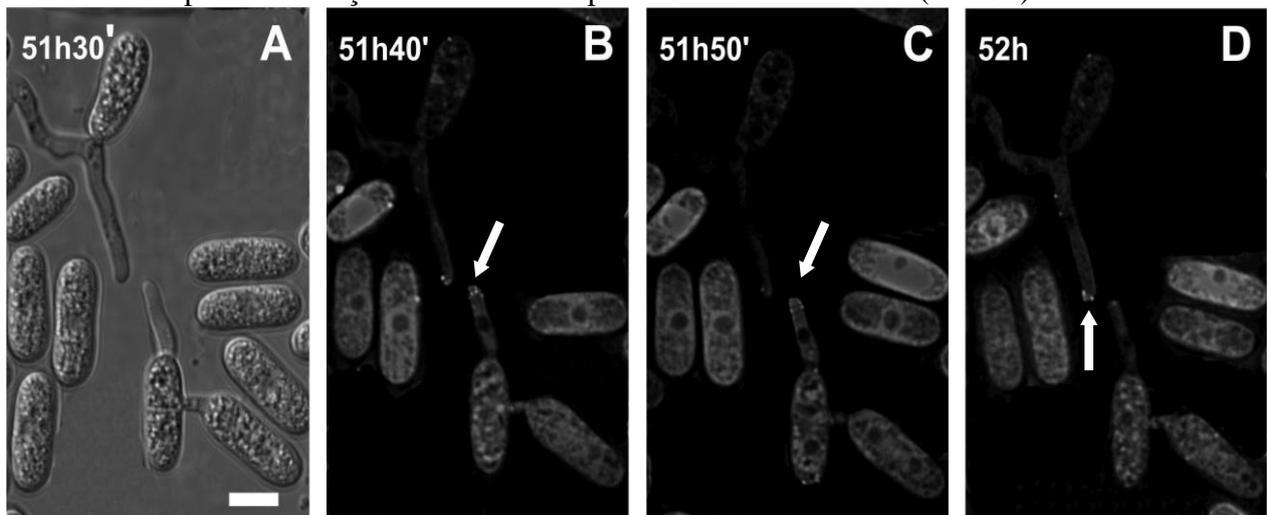
Figura 5 Dendograma de identidade genética para o gene *so* entre espécies de *Colletotrichum* e outras espécies de fungos filamentosos.



4.2.2 Estudo da comunicação e formação dos CATs

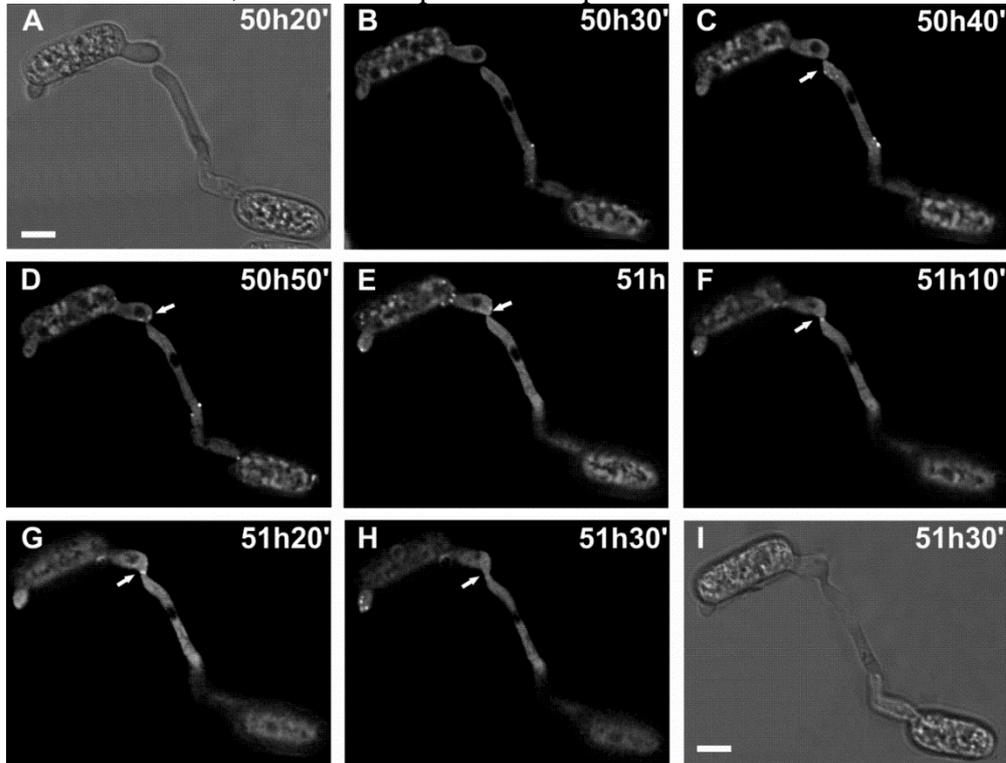
A proteína CLSO foi localizada no citoplasma dos conídios. Durante a formação dos CATs, quando os conídios estavam próximos, ocorreu o recrutamento oscilatório da proteína CLSO e GLSO em *C. lindemuthianum* (Figura 6). Nos conídios aos pares, que estavam submetidos à atração quimiotrópica, as proteínas CLSO+GFP e GLSO+GFP formaram um complexo (sinal) na ponta do CAT de um parceiro, enquanto no outro parceiro a proteína apresentou distribuição difusa no citoplasma. Depois de 10-20 min, o sinal na ponta dispersou no citoplasma, enquanto no outro parceiro, CLSO ou GLSO acumulou na ponta do CAT. O sinal foi alternando entre os parceiros em diferentes intervalos de 10-20 min até o contato que ocorreu em média de 1h 30 min, o intervalo foi de 50 min a 2h 10min, a partir de cinco repetições (Figura 7). No ponto de contato entre as pontas, apareceu um sinal (Figuras 7F, 7G e 8B) e este se manteve por alguns minutos (entre 10-20 min) até desaparecer completamente (Figuras 7F a 7H e 8D).

Figura 6 Localização da proteína CLSO nas pontas dos conídios em comunicação celular para a formação de CATs na espécie *C. lindemuthianum* (LV134).



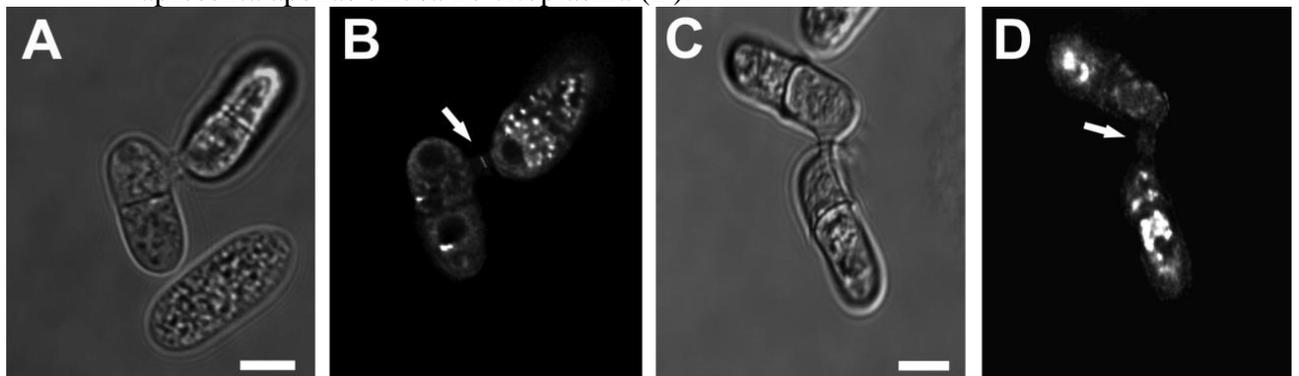
Legenda: A. DIC. B-D. CLSO+GFP apresentou recrutamento oscilatório nas pontas durante formação de CATs por microscopia fluorescente. Setas indicam o acúmulo da proteína nas pontas dos conídios em formação de CATs. Barra: 5µm.

Figura 7 Recrutamento oscilatório da proteína GLSO nas pontas dos conídios em formação de CATs da espécie *Glomerella* sp. (G7-2). Durante a interação celular, GLSO é recrutada do citoplasma para a ponta do conídio em formação de CATs e após 10-20 min, o sinal muda para o outro parceiro de fusão até fundir.



Legenda: A. Conídios em formação de CATs estãoertos e visualizados por DIC. B-E. Recrutamento oscilatório GLSO+GFP. F-G. GLSO+GFP foi visualizado no ponto de contato de fusão de CATs. H. GLSO+GFP desapareceu após a formação do poro. I- Visualização de CATs pela microscopia DIC. B-H. Microscopia fluorescência. Setas indicam o acúmulo da proteína nas pontas dos conídios em formação de CATs (C-E) e no ponto de contato (F-H). Barra: 5µm.

Figura 8 Localização da proteína CLSO após a fusão de CATs na espécie *C. lindemuthianum* (B) e após algum tempo a proteína desaparece do ponto de fusão e apresenta apenas difusa no citoplasma (D).



Legenda: A e B. CLSO+GFP visualizado no ponto de contato da fusão de CATs. C e D. CLSO+GFP visualizado apenas no citoplasma. A e D. Microscopia DIC. B e D. Microscopia Fluorescência. Setas indicam o ponto de fusão entre os conídios. Barra: 5µm.

4.3 Avaliação da inativação do gene *clso* na formação dos CATs

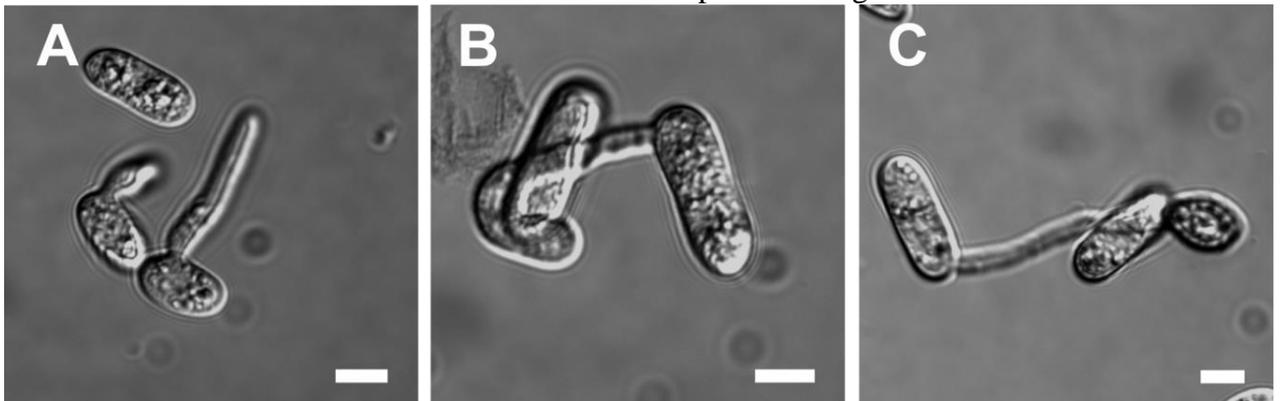
Não foi observada a fusão de CATs quando o gene *clso* e quando o gene *glso* foram inativados em ambas as linhagens ($\Delta clso$ e $\Delta glso$) e, por isso não foram adicionadas na análise estatística (Figura 9). Observou-se que houve o desenvolvimento do tubo de anastomose/germinativo, no entanto, de forma descoordenada. Na análise da formação de CATs entre as linhagens selvagens e as linhagens com o gene restaurado, a fonte de variação linhagens e tempo foram significativas. Após 48h, a porcentagem de CATs apresentou em média, $54\% \pm 25,74$, enquanto que 24h a porcentagem era de $30,25\% \pm 20,45$. As linhagens foram separadas em três grupos no teste Scott-Knott (1974) e os limites inferiores e superiores foram obtidos (Tabela 5).

Tabela 5 Porcentagem de formação de CATs das linhagens selvagens e após os genes serem restaurados e as estimativas dos limites inferiores e superiores.

Linhagens	Formação CATs (%)*	Limites inferiores e superiores
LV134	$22,25 \pm 10,47$ C	7,73-33,27
LV134+ <i>clso</i> + <i>gfp</i>	$20,50 \pm 12,89$ C	9,48-35,02
G7-2	$67,50 \pm 13,53$ A	54,73-80,27
G7-2+ <i>glso</i> + <i>gfp</i>	$58,25 \pm 21,45$ B	45,47-71,02

* Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott.

Figura 9 Mutantes *clso* e *glso* apresentaram crescimento no entanto, não foi direcionado, não ocorrendo a fusão de CATs em ambas as espécies/linhagens de *Colletotrichum*.



Legenda: A. Linhagem G7-2 (*Glomerella* sp.) e B e C linhagem LV134 (*C. lindemuthianum*). A a C-Microscopia DIC. Barra: 5µm.

4.4 Caracterização das linhagens transformadas

As PCR's realizadas para inativação do gene confirmaram a presença do gene *hph* em ambas as linhagens. Além disso, foi observada banda com tamanho correspondente ao cassete de inativação e ausência da banda correspondente aos genes *clso* e *glso*, foram usadas as

linhagens selvagens para comparação. Para as linhagens com os genes restaurados, esporos de cada colônia foram observados em microscopia de fluorescência e selecionadas as colônias para cada espécie.

4.4.1 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e diâmetro colonial

As linhagens foram estatisticamente diferentes para as duas características avaliadas. O teste Scott-Knott separou para ambas as características as linhagens da espécie *Glomerella* sp. da espécie *C. lindemuthianum* (Tabela 6).

4.4.2 Taxa de esporulação e porcentagem de germinação

Para a taxa de esporulação, as linhagens avaliadas foram estatisticamente diferentes e formaram dois grupos diferentes pelo teste Scott-Knott, separando as duas linhagens transformadas LV134 das demais linhagens (Tabela 6). No experimento de porcentagem de inibição, apenas a fonte de variação Tempo foi significativo e o tempo de 48 horas apresentou maior número de conídios germinados ($76,33\% \pm 7,39$) em contraste ao tempo de 24h ($31,67\% \pm 14,82$) (Tabela 6).

Tabela 6 Caracterização das espécies *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. para as características Taxa de esporulação ($\times 10^6$ conídios/mL), diâmetro colonial (mm), Índice de Velocidade do crescimento micelial (IVCM-mm/dia) e Porcentagem de Germinação (%) para as linhagens selvagens, com os genes inativados e após serem restaurados.

Linhasgens	Taxa Esporulação ($\times 10^6$ conídios/ml) *	Diâmetro Colonial (mm)*	IVCM (mm/dia)*	Germinação (%)*
LV134	1,90 \pm 0,71 B	39,00 \pm 2,00 B	3,20 \pm 0,20 B	54,75 \pm 23,61
$\Delta cIso$ LV134	4,18 \pm 0,60 A	38,67 \pm 4,04 B	3,13 \pm 0,42 B	56,00 \pm 21,25
LV134+ <i>cIso</i> + <i>gfp</i>	4,85 \pm 0,85 A	39,67 \pm 2,52 B	3,13 \pm 0,21 B	55,75 \pm 27,27
G7-2	0,98 \pm 0,53 B	68,67 \pm 3,21 A	6,10 \pm 0,30 A	58,25 \pm 32,84
$\Delta gIso$ G7-2	1,05 \pm 0,21 B	73,00 \pm 2,00 A	6,60 \pm 0,20 A	53,75 \pm 25,71
G7-2+ <i>gIso</i> + <i>gfp</i>	0,88 \pm 0,18 B	69,67 \pm 2,52 A	6,23 \pm 0,31 A	45,50 \pm 37,06

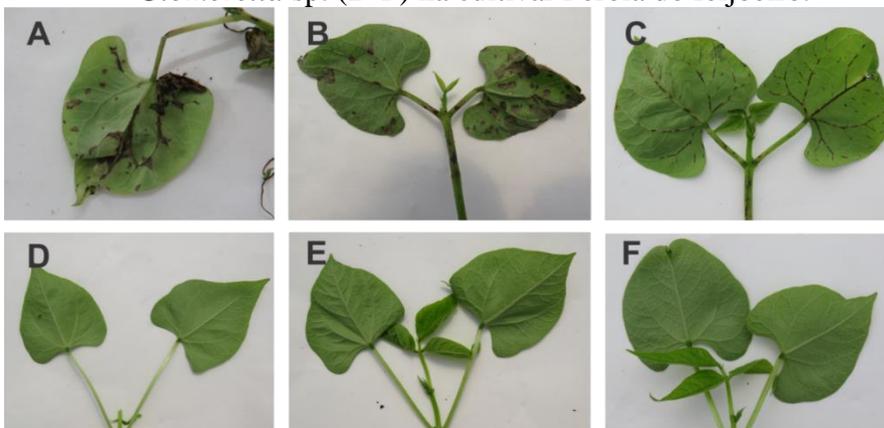
* Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo (P <0,05) de acordo com o teste de Scott-Knott.

4.4.3 Teste de patogenicidade

Neste experimento, as linhagens e seus respectivos transformantes foram inoculadas nas cultivares de feijoeiro (Figura 10). No entanto, a análise de variância das notas de

severidade foi realizada para a linhagem LV134 e seus transformantes pois, as demais linhagens de *Glomerella* não foram patogênicas. Apenas a fonte de variação Cultivar foi significativa, formando dois grupos estatisticamente distintos no teste Scott-Knott. A cultivar Majestoso apresentou-se resistente a todas as linhagens avaliadas e formou um grupo isolado apresentando nota média da severidade da antracnose de $1,92 \pm 1,33$. As cultivares Ouro Negro e Pérola apresentaram-se suscetíveis e formaram um segundo grupo com notas médias de $8,2 \pm 0,98$ e $7,34 \pm 1,77$, respectivamente.

Figura 10 Sintomas de antracnose causados pelas linhagens selvagens, com genes inativados e depois quando os genes foram restaurados em *C. lindemuthianum* (A-C) e *Glomerella* sp. (D-F) na cultivar Pérola do feijoeiro.



Legenda: A linhagem LV134, de *C. lindemuthianum*, não alterou a patogenicidade quando o gene *clso* foi inativado, $\Delta clso$ (B) e nem quando o gene foi restaurado, $+clso+gfp$ (C) quando comparado com a testemunha (A). Já a linhagem G7-2, de *Glomerella* sp. não apresentou sintoma na sua forma selvagem (D), mantendo-se não patogênica quando o gene foi inativado, $\Delta glso$ (E) e quando foi restaurado, $+glso+gfp$ (F).

4.5 Formação de CATs entre as espécies *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp.

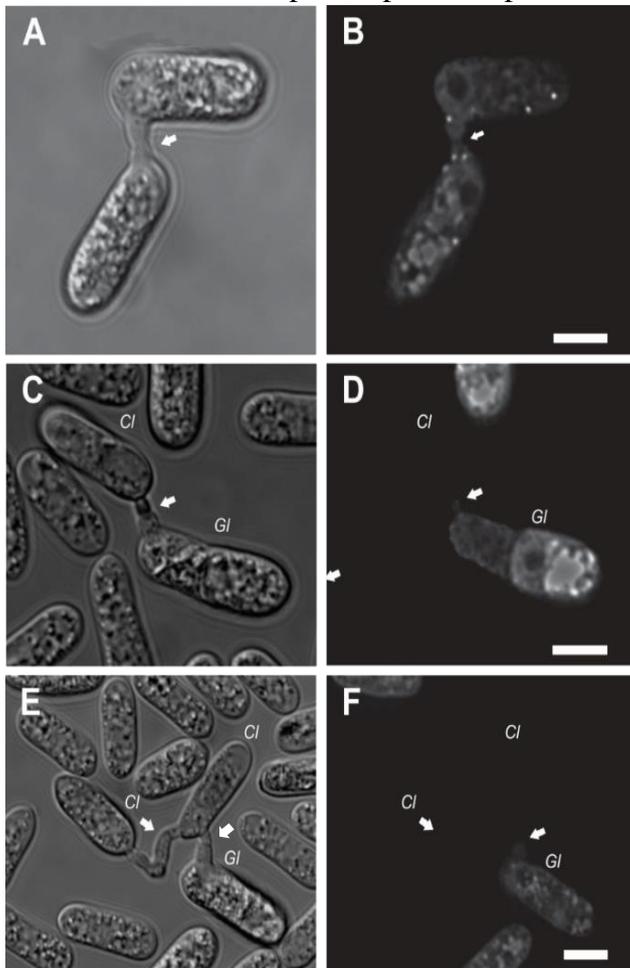
Conídios da linhagem selvagem LV134 e da linhagem transformada $G7-2+glso+gfp$ foram misturados em concentrações iguais e avaliada a formação de CATs entre e dentro das espécies (Figura 11). Foi observada a formação de CATs entre as duas espécies e dentro das espécies de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp., esta última apresentou maior porcentagem de fusão e foi separada em um grupo estatisticamente diferente das demais (Tabela 7).

Tabela 7 Porcentagem de fusão de CATs dentro e entre as espécies *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. (Linhagens LV134 e $G7-2+glso+gfp$, respectivamente).

Linhagens	% Fusão de CATs*
LV134/LV134	$8,00 \pm 2,65$ B
$G7-2+glso+gfp/G7-2+glso+gfp$	$23,00 \pm 1,15$ A
LV134/ $G7-2+glso+gfp$	$8,67 \pm 1,73$ B

* Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott.

Figura 11 Formação de CATs entre e dentro as espécies de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp., sendo que foi utilizada a linhagem selvagem LV134 e a linhagem G7-2 transformada para expressar a proteína GLSO+GFP.



Legenda: Observação da formação de CATs por microscopia DIC (A, C e E) e por microscopia de fluorescência (B, D e F). A figura A e B indica a formação de CATs dentro da linhagem G7-2+*glso*+*gfp*. Já a figura C e D apresenta a formação de CATs entre as linhagens LV134 e G7-2+*glso*+*gfp*. As figuras E e F apresentam a fusão de CATs dentro da linhagem LV134 e também entre esta linhagem e a G7-2+*glso*+*gfp*. As setas indicam o ponto de fusão de CATs. Cl. - *C. lindemuthianum* e Gl - *Glomerella* sp. Escala: 5µm.

5 DISCUSSÃO

As linhagens de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp. estudadas foram isoladas de lesões de antracnose, a primeira causa a doença e a segunda não foi patogênica aos 10 dias e não corresponde a fase sexual do *C. lindemuthianum* (BARCELOS et al., 2014). Ambas as espécies apresentaram formação de CATs e também, incompatibilidade micelial e sexual entre e dentro de espécies. A incompatibilidade já tem sido relatada em outros estudos, em que mostram a ocorrência de incompatibilidade entre linhagens de *C. lindemuthianum* (ISHIKAWA, 2012; PINTO et al., 2012) e entre as espécies de *Glomerella* e *C.*

lindemuthianum (BARCELOS, 2014; MOTA et al., 2016). A incompatibilidade vegetativa entre linhagens de *C. lindemuthianum* pode ser suprimida pela formação de CATs e a transferência de núcleos entre as linhagens têm sido observadas (ISHIKAWA et al., 2012). Essa espécie apresentou conídios uninucleados antes e após a formação de CATs, assim como observado no presente estudo, em que ambas as espécies apresentaram apenas um núcleo nos conídios, na germinação e na formação de CATs. No presente estudo, mitocôndrias foram observadas como pequenos filamentos distribuídos pelo conídio, assim como são tipicamente visualizadas em demais fungos filamentosos (WESTERMANN; PROKISCH, 2002). A localização das mitocôndrias foi, principalmente, nas periferias e também ao redor do núcleo na formação de CATs (Figura 3), uma vez que ocorre a duplicação do mesmo e essas organelas são responsáveis pela maior síntese de ATP (PAUMARD et al., 2002).

Durante a conexão por CATs, alguns eventos especiais ocorrem, como a supressão da compatibilidade vegetativa, troca de nutrientes, água, moléculas sinalizadoras, mitocôndrias e outras organelas (READ et al., 2009). A formação de CATs tem sido relatada no gênero *Colletotrichum* (BARCELOS et al., 2014; GONÇALVES; VELHO; STADINIK et al., 2016; ISHIKAWA et al., 2012; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012), principalmente em *C. lindemuthianum*, espécie em que esse fenômeno foi descrito, detalhadamente, pela primeira vez (ROCA et al., 2003). No presente estudo, a temperatura se apresentou como um fator determinante na formação de CATs nessas espécies, a temperatura ideal para a formação foi de 20°C. Esse resultado pode ser explicado, uma vez que a melhor temperatura para o desenvolvimento da espécie é entre 17 e 25°C (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Já se sabe que outros fatores favorecem a formação de CATs em *Colletotrichum*, como a idade da colônia, a densidade dos conídios, nutrientes (meio de cultura pobre: água) e longo tempo de incubação (após 48h) (ISHIKAWA et al., 2010a; ROCA; READ; WHEALS, 2005). Observou-se que ambas as linhagens formaram CATs, no entanto a espécie *Glomerella* sp. apresentou maior taxa de formação que *C. lindemuthianum*, assim como já relatado na literatura (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016). Houve redução na porcentagem de CATs à 22° C para as linhagens de ambas as espécies, no entanto, para *C. lindemuthianum* houve aumento dos CATs na temperatura de 24° C. É interessante esse efeito da temperatura, uma vez que em campos de feijoeiro tem sido observada a ocorrência de sintomas de sarna, doença emergente no feijoeiro e que são causados por linhagens de *Colletotrichum/Glomerella*. Esses sintomas, normalmente ocorrem na safra das águas de plantio do feijoeiro no Brasil, em anos/locais em que as temperaturas são mais elevadas. Essas linhagens foram inoculadas em plantas de feijoeiro causando sintomas de ambas as doenças

(DIAS et al., 2017). Além disso, a formação de CATs entre linhagens de ambas as espécies foi observada no presente trabalho.

Em *N. crassa*, na fase de quimioatração dos CATs, tem sido sugerido que o gene *so* pode estar ligado diretamente a regulação da síntese ou liberação de uma substância quimioatrativa, bem como, receptora desse sinal químico (READ; GORYACHEV; LICHUIS, 2012). Nessa fase ocorre a troca oscilatória das proteínas SO e MAK-2 nas extremidades dos CATs em formação, enquanto os mutantes Δso não direcionam seu crescimento, ou seja, não há quimiotropismo positivo (FLEISSNER et al., 2009). Para entender como ocorre o processo em espécies de *Colletotrichum*, o gene *so* foi localizado nas espécies de *C. lindemuthianum* e *Glomerella* sp.. Assim como nas demais espécies em que esse gene foi descrito, as espécies avaliadas apresentaram o domínio WW. Esse domínio tem se apresentado como mediador das interações proteína-proteína por meio do reconhecimento de ligantes contendo prolina (FLEISSNER et al., 2005). O tamanho do gene foi de, aproximadamente 4kb, similar aos das demais espécies em que esse gene já foi descrito (CHARLTON et al., 2012; CRAVEN et al., 2008; ENGH et al., 2007; FLEISSNER et al., 2005; PRADOS ROSALES; DI PIETRO 2008). Observou-se, também, que houve alta similaridade das sequências gênicas entre as duas espécies estudadas e linhagens de *C. lindemuthianum*, bem como, em relação às demais espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Portanto, esse gene é conservado dentro do gênero, assim como nos demais fungos filamentosos avaliados pelo dendograma de identidade gênica (Tabela 4).

Os genes foram marcados com o gene para proteína fluorescente GFP, a fim de localizar a sua expressão na formação de CATs. A primeira localização foi no citoplasma dos conídios e quando os conídios foram se aproximando para a formação de CATs, a proteína apresentou recrutamento oscilatório na ponta dos conídios, assim como descrito para *N. crassa*. Esse recrutamento diferiu apenas no tempo em que a oscilação ocorreu, para *N. crassa* é entre 6-12 min e para *Colletotrichum/Glomerella* foi entre 10-20min (FLEISSNER et al., 2009). A diferença no tempo para ocorrer a oscilação pode estar associada com o tempo para a formação de CATs nessas espécies, uma vez que em *N. crassa* a formação é mais rápida, ou seja, em seis horas pode-se observar todo processo de formação de CATs (READ et al., 2009) e para *Colletotrichum* é a partir de 24h, a melhor visualização é após 48h, tempo observado neste e em outros estudos (ISHIKAWA et al. 2010a, 2012). Após ocorrer a fusão, a proteína permaneceu no ponto de contato de 10 a 20 min até desaparecer completamente, assim como em *N. crassa* (FLEISSNER et al., 2009). Este é o primeiro relato da ocorrência do modelo ping-pong proposto para *N. crassa* em um fungo fitopatogênico.

O gene *clso* e *glso* foram inativados e observou-se que houve o desenvolvimento do tubo de anastomose, no entantode forma descoordenada. Não foi observado crescimento direcionado entre os conídios com tubos em desenvolvimento, houve perda do quimiotropismo positivo (Figura 8), ao contrário do que foi observado na linhagem com a expressão da proteína CLSO marcada com GFP (Figura 6). O gene *so* foi silenciado nas espécies *N. crassa* e *F. oxysporum* e foi observado que essa inativação inibiu a formação de CATs nessas espécies, e, quando o mesmo foi restaurado, essas espécies recuperaram a capacidade de se fundir, indicando ser essencial para a formação de CATs (FLEISSNER et al., 2005; PRADO-ROSALES; DI PIETRO, 2008). Quando o gene foi restaurado no presente estudo, as linhagens recuperaram o crescimento coordenado e formaram CATs. Portanto, esse gene também foi essencial para a formação de CATs nessas espécies e na formação de anastomoses entre hifas de *E. festucae* e *A. brassicola*, espécies que não formam CATs (CHARLTON et al., 2012; CRAVEN et al., 2008).

Além de interferir na formação de CATs, foi observado em *N. crassa* que outras características foram afetadas com a inativação gene *so*, como a redução da hifa aérea, diminuição na taxa de crescimento, alteração na formação de conídios e esterilidade da fêmea (FLEISSNER et al., 2005). Portanto, esse gene apresenta efeito pleiotrópico nessa espécie. No entanto, no presente trabalho, não foi observada alteração na taxa de esporulação e germinação, índice de velocidade do crescimento micelial e diâmetro colonial nas linhagens quando o gene foi inativado e posteriormente, restaurado. Além disso, os resultados obtidos da avaliação dessas características foram coincidentes com os obtidos por Barcelos et al. (2014) e Mota et al. (2016). Como *C. lindemuthianum* é um fungo patogênico e tem sido observada a formação de CATs no feijoeiro (ISHIKAWA et al., 2010b), a ocorrência de efeito pleiotrópico do gene *clso* e *glso* para essas características poderia afetar a sua sobrevivência no feijoeiro. Essas características são importantes, pois interferem antes e após o processo de infecção de um patógeno no hospedeiro (Ishikawa et al. 2010b). Ausência de efeito pleiotrópico do gene *so* para a formação de conídios e a taxa de crescimento micelial foi observada em *A. brassicola*, *E. festucae* e *F. oxysporum* (CHARLTON et al., 2012; CRAVEN et al., 2008; PRADO ROSALES; DI PIETRO, 2008). Entre as características avaliadas no presente trabalho e que não foram avaliadas nas demais, a porcentagem de germinação de conídios se destaca. No processo de pré-infecção de *C. lindemuthianum*, a germinação dos conídios é essencial para que haja a formação e crescimento do tubo germinativo e do apressório (ISHIKAWA et al. 2010a). Tubos germinativos exibem quimiotropismo negativo em direção a outro (evita outro tubo germinativo) enquanto, os CATS apresentam

quimiotropismo positivo, isto é, direcionam-se a outros CATs (LICHIOUS et al., 2014). Nessa espécie, a maior porcentagem de conídios germinados ocorre em colônias jovens, ao contrário do que ocorre no processo de formação de CATs, assim, existe uma relação inversa entre essas duas características (ISHIKAWA et al. 2010a).

A proteína SO pode estar envolvida na interação patógeno-hospedeiro, e essa relação foi investigada no presente trabalho. Observou-se que a linhagem LV134, pertencente à espécie *C. lindemuthianum*, apresentou-se patogênica e com a mesma virulência na cultivar Ouro Negro e Pérola que as linhagens transformadas, isto é, a linhagem LV134 com gene *clso* silenciado e quando o mesmo foi restaurado. Resultado semelhante foi observado para linhagem G7-2 pertencente a espécie *Glomerella* sp., em que nenhuma linhagem foi patogênica às cultivares do feijoeiro. Há relatos que a linhagem LV134 é patogênica e causa a antracnose do feijoeiro, e que a linhagem G7-2 não causa nenhum sintoma no feijoeiro após dez dias de avaliação (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; PINTO et al., 2012). Nessas espécies, podemos observar que a proteína não está envolvida na interação patógeno-hospedeiro, como observado para *F. oxysporum* (PRADOS ROSALES; DI PIETRO, 2008). O contrário foi observado em *A. brassicola*, que a proteína foi essencial para a patogenicidade e em *E. festucae* que na ausência da proteína esse fungo endofítico apresentou-se patogênico (CHARLTON et al., 2012; ENGH et al., 2007).

No presente estudo, foi observada a formação de CATs entre as duas espécies de *Colletotrichum* e *Glomerella* que coabitam lesões de antracnose no feijoeiro. Nas figuras 9E e 9F observam-se três conídios em anastomoses sendo dois de *C. lindemuthianum* e um de *Glomerella* sp.. Pode haver mutualismo entre essas espécies que podem trocar nutrientes beneficiando ambas no estabelecimento no feijoeiro. Apesar da diferença no tamanho e na estimativa da similaridade gênica (78,26%) para o gene *so* em ambas as espécies, não existe especificidade na atração dos conídios para fusão. Esse resultado sugere que, também, pode estar ocorrendo a troca de material genético entre as espécies, uma vez que não ocorre a compatibilidade sexual entre elas e poderia explicar a ampla variabilidade observada nos estudos populacionais (BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016, PINTO et al., 2012). Em outros estudos, a formação de CATs é geralmente estudada em conídios que possuem genótipos idênticos (FLEISSNER et al., 2009, READ; GORYACHEV; LICHIOUS, 2012). No entanto, em *C. lindemuthianum* foi observada a formação de CATs entre duas linhagens de raças diferentes, uma da raça 65 que o núcleo foi marcado com GFP e outra da raça 72 com o núcleo marcado RFP (ISHIKAWA et al., 2012). Durante esses eventos, foram observados núcleos amarelos no citoplasma e duas hipóteses foram consideradas, ou seja, ocorreu uma

mistura das proteínas fluorescentes e/ou a fusão dos dois núcleos. Recombinantes foram recuperados de colônias heterocarióticas e um deles apresentou sintomas nas cultivares diferenciadoras sendo classificado como raça 8 (ISHIKAWA et al., 2012). Roca et al. (2004) observaram a formação de CATs entre as espécies de *C. lindemuthianum* e *C. gossypii*.

A formação de CATs pode levar à troca de material genético, devido à formação de heterocário. A dinâmica nuclear não foi seguida durante essas fases, mas como resultado de uma posterior interação nuclear, o polimorfismo cromossômico já descrito no gênero *Colletotrichum*, poderia ser explicado (GARRIDO et al., 2009; MASEL; IRWIN; MANNERS, 1993; O'CONNELL et al., 2012; O'SULLIVAN et al., 1998). Em *C. lindemuthianum*, a linhagem LV134 apresenta um número básico de oito cromossomos e há polimorfismo cromossômico nessa espécie em relação a outras linhagens de mesma raça ou de raças diferentes (GONÇALVES, 2016). Linhagens de *Glomerella* também foram estudadas e apresentaram polimorfismo, no entanto, menor do que observado para *C. lindemuthianum*. Similaridade entre os cromossomos de linhagens de ambas as espécies, foi detectada o que suporta a hipótese de recombinação entre essas espécies no feijoeiro por meio dos CATs. Os benefícios de um genoma acessório, como potencial aquisição de novos fatores de virulência que podem expandir a variedade de hospedeiros têm sido relatados na literatura (CROLL; MCDONALD, 2012; MA et al., 2010). Vale ressaltar, como mencionado anteriormente, que a formação de CATs *in vivo* já foi observada para *C. lindemuthianum* por Ishikawa et al. (2010b) e também, entre espécies de *Colletotrichum* da macieira (GONÇALVES; VELHO; STADINIK, 2016). Assim, a formação de CATs pode estar ocorrendo em condições naturais, já que foi observada a formação entre *Colletotrichum* e *Glomerella* no experimento *in vitro*, aumentando a evidência de estar ocorrendo troca de material genético entre as espécies que coabitam o feijoeiro comum.

A comunicação celular ocorre na formação de CATs da mesma espécie e de espécies diferentes, o gene *so* é essencial para o processo. Quando o gene foi silenciado, a formação de CATs não ocorreu, e isso não afetou outras características, especialmente a patogenicidade. Neste estudo, o mecanismo de comunicação oscilatória é pela primeira vez descrito em fungos fitopatogênicos. Os resultados mostram a formação de CATs entre espécies que coabitam lesões de antracnose e assim os CATs podem desempenhar um papel chave na transferência genética horizontal, afetando a variabilidade encontrada nessa espécie, na qual a reprodução sexual não foi observada na natureza. O feijoeiro é cultivado no Brasil três vezes ao ano e em diferentes condições ambientais, proporcionando um ambiente favorável para ocorrer a formação de CATs nas espécies. Acrescenta-se ainda, que neste estudo foi analisado

um sistema biológico complexo, mas que por sua natureza simples permite o entendimento da possível origem de novas espécies do gênero *Colletotrichum*, e que causam outras doenças, como a sarna do feijoeiro. Essas informações podem auxiliar no manejo dessas doenças, tanto por meio do controle químico como pela resistência genética do feijoeiro. Além disso, permite o avanço do conhecimento sobre a dinâmica evolucionária do gênero *Colletotrichum*.

6 CONCLUSÕES

- Dentre as temperaturas testadas para a formação de CATs, a ideal é a 20°C para as linhagens avaliadas;
- Existe incompatibilidade micelial e sexual entre as duas linhagens/espécies.
- O recrutamento oscilatório da proteína CLSO e GLSO ocorre durante a formação de CATs nas espécies de *C.lindemuthianum* e *Glomerella* sp., respectivamente.
- A proteína SO é essencial para a fusão de CATs para ambas as espécies avaliadas;
- O gene *so* não apresenta efeito pleiotrópico para o crescimento micelial, porcentagem de conídios germinados, taxa de esporulação e patogenicidade/virulência;
- Há formação de CATs entre as linhagens de *C.lindemuthianum* e *Glomerella* sp. e não há especificidade para a escolha do parceiro de fusão.

7 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.
- ANDRÉ, B.; SPRINGAEL, J. WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova York, v. 205, n. 2, p. 1201-1205, Dec. 1994.
- ARMSTRONG-CHO, C. L.; BANNIZA, S. *Glomerella truncata* sp. nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 8, p. 951–956. Ago. 2006.
- ARAÚJO, L.; STADINIK, M. J. Multiple appressoria and conidia anastomosis tubes in the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on apple. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 2, p. 180-183, Apr./Jun. 2013.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismo**. Goiânia: UFG, 1998. 490 p.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 90910, Mar. 2014.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, L. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.
- BARCELOS, Q. L.; SOUZA, E. A.; SILVA, K. J. D. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 230-242, Jan./Feb. 2011.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BEREPIKI, A. et al. F-actin dynamics in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v.9, n. 4, p. 547-557, Apr. 2010.
- CARBONELL, S. A. M. et al. Anthracnose. In: PAULA JÚNIOR, T. J.; WENDLAND, A. **Melhoramento Genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, EPAMIG, 2012, p.15-39.
- CASTRO-PRADO, M. A. A. et al. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 634-642, May/June. 2007.

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. (Ed.). **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53.

CHARLTON, N. D. et al. Deletion of the fungal gene *soft* disrupts mutualistic symbiosis between the grass endophyte *Epichloë festucae* and the host plant. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 11, n. 12, p. 1463-1471, Dec. 2012.

CROLL, D.; MCDONALD, B. A. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 4, Apr. 2012.

CRAVEN, K. D. et al. Anastomosis is required for virulence of the fungal necrotroph *Alternaria brassicicola*. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 7, n. 4, p. 675-683, Apr. 2008.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, Out./Dec. 2003.

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

DIAS, M. A. et al. Characterization of *Colletotrichum spp.* strains from common bean anthracnose and scab lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Palo Alto, v. 60, n. 1. 2017 (*In press*).

DI PIETRO, A. et al. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1140-1152, Mar. 2001.

ENGH, I. et al. The WW domain protein PRO40 is required for fungal fertility and associates with woronin bodies. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 6, n. 5, p. 831-843, May. 2007.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J.D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. In: VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. **Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress**. Hoboken:Wiley Blackwell, v. 1, 2013, p. 151-181.

FLEISSNER et al. The *so* locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 4, n. 5, p. 920-930, May. 2005.

FLEISSNER, A.; GLASS, N. L. SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 6, n. 1, p. 84-94, Jan. 2007.

FLEISSNER, A. et al. Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 106, Jun. 2009.

FLEISSNER, A.; DIAMOND, S.; GLASS, N.L. The *Saccharomyces cerevisiae* PRM1 homolog in *Neurospora crassa* is involved in vegetative and sexual cell fusion events but also has postfertilization functions. **Genetics**, Austin, v.181, n. 2, p. 497-510, Feb, 2009.

GARCÍA-SERRANO, M. et al. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 312-317, Sept. 2008.

GARRIDO, C. et al. Phylogenetic relationships and genome organisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. **Europe Journal of Plant pathology**, Cambridge, v. 125, p. 397-411, Jun. 2009.

GIETZ; R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 31-34, Jan. 2007.

GLASS, N. L.; JACOBSEN, D.; SHIU, P. K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 165-186, 2000.

GLASS, N. L.; FLEISSNER, A. Re-wiring the network: understanding the mechanism and function of anastomosis in filamentous ascomycete fungi. In: KUES, U.; FISCHER, R. **Growth, differentiation and sexuality**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p.123-139.

GONÇALVES, A. E.; VELHO, A. C.; STADNIK, M. J. Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 3, p. 497-506, Apr. 2016.

GONÇALVES, P. R. C. **Cariotipagem de linhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp. isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2016. 67 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

GORYACHEV, A.B. et al. The concept of “excitable behavior” can explain the “pingpong” mode of communication between cells using the same chemoattractant. **BioEssays**, Cambridge, v. 34, n. 4, p. 2559-2566, Apr. 2012.

GUERBER, J. C.; CORRELL, J.C. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 1, p. 216–229, Feb. 2001.

HEIMAN, M. G.; WALTER, P. Prm1p, a pheromone regulated multispanning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 151, n. 3, p. 719–730, Oct, 2000.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista de Biologia**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 156-161, Mar./Apr. 2008.

ISHIKAWA, F. H. et al. *Colletotrichum lindemuthianum* exhibits different patterns of nuclear division at different stages in its vegetative life cycle. **Mycologia**, New York, v. 105, n. 4, p. 795-801, 2013.

_____. Heterokaryon Incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 31175, Feb. 2012.

_____. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2–9, Jan. 2010a.

_____. Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 270-257, Aug. 2010b.

_____. Factors Affecting the Production and Regeneration of Protoplasts from *Colletotrichum Lindemuthianum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 74-79, Jan./Feb. 2010c.

ISLEY, J. L.; SUDOL, M.; WINDER, S. J. The WW domain: linking cell signaling to the membrane cytoskeleton. **Cellular signalling**, Oxford, v.14, n.3, p. 183-189, Mar. 2002.

KAUFMAN, B.; RICHARDS, S.; DIERIG, D. A. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 111-114, Apr. 1999.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. Et v. Scherenk. f. sp. *phaseoli* n. f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, n. 27, p. 411-437, 1970.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 690 p.

LICHIUS, A., BEREPIKI, A., READ, N.D. Form follows function e the versatile fungal cytoskeleton. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 115, n.6, p. 518-540. Jun. 2011.

LICHIUS, A. et al. Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. **PLoS One**, San Francisco, v.71, e30372, Jan. 2012.

_____. CDC-42 and RAC-1 regulate opposite chemotropisms in *Neurospora crassa*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 127, n. 9, p. 1953-1965, May, 2014.

MA, L. J. et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**, London, v. 464, n. 7287, p. 367-73, Mar. 2010.

MACIAS, M. J.; WIESNER, S.; SUDOL, M. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. **FEBS Letter**, Amsterda, v. 513, n. 1, p. 30-37, Feb. 2002.

MASEL, A.W.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Mini–chromosomes of *Colletotrichum spp.* infecting several host species in various countries. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 7, p. 852-856, Jul. 1993.

MEHRABI, R. et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 35, p. 542-554, May. 2011.

- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum* Teleomorfo: *Glomerella*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, n. 1, p. 170-179, Aug. 2006.
- MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p.1-22, Apr. 2016.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.
- O'CONNELL, R. J.; NASH, C.; BAILEY, J. A. Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**, CAB International, Wallingford, 1992. p 67-87.
- O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, London, v. 44, n. 9, p. 1060- 1067, Sep. 2012.
- O' SULLIVAN, D. et al. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 33, n.4, p. 291-298, Apr. 1998.
- PAUMARD, P. et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. **The EMBO journal**, v. 21, n. 3, p. 221-230, Feb. 2002.
- PEREIRA, R. et al. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 224-225, 2010.
- PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 490-497, May 2012.
- PINTO, J. M. A. **Variabilidade de isolados sexuais e assexuais de lesões de antracnose do feijoeiro**. 2012. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- PRADOS ROSALES, R. C.; DI PIETRO, A. Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 7, n.1, p. 162-171, Jan. 2008.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan. 1985.
- RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 167-172, Jun. 1994.

READ, N. D.; GORYACHEV, A. B.; LICHIOUS, A. The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. **Fungal biology reviews**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 1-11, Apr. 2012.

READ, N. D. et al. Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 608-615, Dec. 2009.

READ, N.D.; ROCA, M.G. Vegetative hyphal fusion in filamentous fungi. In: BALUSKA, F. (Ed.). **Cell-cell channels**. Georgetown: Landes Bioscience, 2006. p. 87-98.

ROCA, M. M. G.; DAVIDE, C. L; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 367-373, jul./ago. 2003.

ROCA et al. Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. **Fungal Biology**, Cambridge, v.6, n. 2, p. 379-387, Mar. 2012.

_____. Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 9, n. 8, p. 1171-1183, Aug. 2010.

_____. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Lawrence, v. 4, n. 5, p. 911–919, May. 2005.

_____. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycology Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1320–1326, Nov. 2004.

_____. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 138-145, Nov. 2003.

ROCA, M. G.; READ, N. D.; WHEALS, A. E. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, n. 2, p. 191–198, Aug. 2005.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control** (s), CAB, Oxford, 1992. p. 47–76.

RODRÍGUEZ- GUERRA, R. et al. Variation in genotype, pathotype and anatomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 52, n. 2, p. 228-235, Apr. 2003.

RUIZ-ROLDÁN, M. et al. Nuclear dynamics during germination, conidiation, and hyphal fusion of *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic cell**, Lawrence, v. 9, n. 8, p. 1216-1224, Aug. 2010

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 457-477.

- SAUPE, S. J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 489-502, Jun. 2000.
- SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system the evaluation of bean germoplasm**. Cali: CIAT, 1987. 54 p.
- SCHWARTZ, H. F. Anthracnose. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean disease**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1994. p. 16-17.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.
- SILVA, K. J. D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 2007.
- SOUZA, E. A.; CAMARGO JÚNIOR, O. A.; PINTO, J. M. A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, May/Jun. 2010.
- VAILLANCOURT, L.; WANG, J.; HANAU, R. *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction: genetic regulation of sexual compatibility. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Glomerella graminicola**. Saint Paul: APS, 2000. p. 29-44.
- VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600 p.
- VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. de O. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1993. 131 p.
- XU, J. R.; HAMER, J. E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genes & development**, v. 10, n. 21, p. 2696-2706, Nov. 1996.
- WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control** england. Wallingford: CAB International, 1992. p. 167-185.
- WEICHERT, M.; FLEISSNER, A. Anastomosis and heterokaryon formation. In: VAN DEN BERG, M. A.; MARUTHACHALAM, K. **Genetic Transformation Systems in Fungi**, Chan: Springer International Publishing v. 2, 2015. p. 3-21.
- WESTERMANN, B.; PROKISCH, H. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.36, n.2, p.91-97, Jul. 2002.

ZHENG, L. et al. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 7, p. 724-732, Jul. 2000.