

**RAÍSSA MESQUITA BRAGA**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS  
TRANSPONÍVEIS DA CLASSE II EM  
*Colletotrichum graminicola***

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

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

T

B813i  
2012

Braga, Raíssa Mesquita, 1986-  
Identificação e caracterização de elementos transponíveis da  
classe II em *Colletotrichum graminicola* / Raíssa Mesquita  
Braga. – Viçosa, MG, 2012.  
65f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Elementos transponíveis. 2. *Colletotrichum graminicola*.  
3. Fungos fitopatogênicos - Genética. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.56

**RAÍSSA MESQUITA BRAGA**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS  
TRANSPONÍVEIS DA CLASSE II EM  
*Colletotrichum graminicola***

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

APROVADA: 31 de janeiro de 2012.

---

Denise Mara Soares Bazzolli

---

Janaina Aparecida Teixeira

---

Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Coorientador)

---

Marisa Vieira de Queiroz  
(Orientadora)

*“Penso que só há um caminho para a ciência ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonar-se por ele.”*

*Karl Popper*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Milho e Sorgo pelo fornecimento dos isolados de *Colletotrichum graminicola* utilizados nessa pesquisa.

À minha orientadora, Marisa Vieira de Queiroz, por toda a atenção, dedicação e esforço.

Aos outros professores do departamento de Microbiologia, pela contribuição à minha formação, em especial a Denise Bazzolli e Antonio Galvão.

Aos funcionários do Bioagro e aos colegas de laboratório e de curso, pela convivência, pela ajuda, pelos risos. Em especial a Cris, Fábio e Wemerson, pelo saudoso quarteto nos momentos mais difíceis das disciplinas. Em especial também a Mateus Ferreira pela ajuda na realização desse trabalho.

À minha amada família, pais, irmãs, tios e primos, que mesmo de longe sempre foram meu alicerce.

Ao meu amor, Guilherme de Oliveira, por ser essa pessoa linda sempre comigo, pela preocupação e pelo apoio.

## **BIOGRAFIA**

Raíssa Mesquita Braga, filha de Antônio Braga Feliciano e Maria Fátima Mesquita Braga, nasceu em 27 de maio de 1986 em Fortaleza, Ceará.

Em março de 2005 ingressou na Universidade Federal do Ceará, graduando-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas em 18 de dezembro de 2009.

Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Genética de Micro-organismos, defendendo a dissertação em 31 de janeiro de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 O fungo <i>Colletotrichum graminicola</i> .....	11
2.2 Elementos transponíveis .....	12
2.3 Classificação dos elementos transponíveis.....	14
2.4 Elementos transponíveis e o genoma .....	15
2.5 Importância do estudo de elementos transponíveis.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS DA SUPERFAMÍLIA <i>Tc1-Mariner</i> EM <i>Colletotrichum graminicola</i> .....	28
3.1 Resumo .....	28
3.2 Introdução .....	30
3.3 Resultados .....	33
3.3.1 Identificação de transposons no genoma de <i>C. graminicola</i> .....	33
3.3.2 Local de inserção dos transposons .....	37
3.3.3 Análise de RIP .....	39
3.3.4 Transposon TCg1 .....	40
3.4 Discussão.....	44
3.5 Conclusões .....	47
3.6 Metodologia .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
ANEXO 1 .....	56
ANEXO 2 .....	59
ANEXO 3 .....	64
ANEXO 4 .....	65

## RESUMO

BRAGA, Raíssa Mesquita, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2012. **Identificação e caracterização de elementos transponíveis da classe II em *Colletotrichum graminicola*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Elza Fernandes de Araújo e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

*Colletotrichum* é um dos gêneros mais importantes de fungos fitopatogênicos em todo o mundo. As espécies fitopatogênicas desse gênero apresentam ciclo de vida hemibiotrófico e causam doenças em diversas culturas economicamente importantes. Além da importância econômica, *Colletotrichum* possui grande relevância como um sistema modelo para o estudo das bases celulares e moleculares da patogenicidade fúngica. A espécie *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do milho (*Zea mays*), possui ciclo sexual raro e foi a primeira espécie do gênero a ter o seu genoma completamente sequenciado. Os elementos transponíveis são ubíquos e constituem uma fonte de novas mutações, sendo, portanto, uma importante fonte de variabilidade genética. Esses elementos são divididos em duas classes de acordo com a presença ou ausência de um intermediário de RNA na transposição. Os elementos da classe I se transpõem via intermediário de RNA, enquanto os elementos da classe II se transpõem diretamente como DNA. Os elementos transponíveis podem ser utilizados como agentes mutagênicos visando à identificação e etiquetagem de genes e em estudos filogenéticos e populacionais. Tendo em vista a importância dos elementos transponíveis na geração de variabilidade genética e as suas aplicações na pesquisa, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar elementos transponíveis da classe II no genoma de *C. graminicola*. Para tanto, foi utilizada uma abordagem de bioinformática (análises *in silico*) aliada às atividades experimentais. Foram identificadas 133 sequências completas de elementos transponíveis no genoma sequenciado de *C. graminicola*, que representam uma proporção relevante do genoma (0,47%). Os elementos foram classificados em 6 famílias de acordo com a identidade e apresentam características da superfamília *Tc1-Mariner*. Apesar de algumas transposases putativas codificadas por esses elementos possuírem domínio DDE conservado, todas estão interrompidas por vários códons de parada. Nenhum elemento identificado possui todas as características necessárias para um elemento autônomo. A análise *in silico* revelou evidências de mutações geradas pelo

mecanismo de RIP (Mutação de ponto induzida por repetição). O elemento TCg1, amplificado por PCR a partir de um isolado brasileiro de *C. graminicola*, possui extremidades repetidas invertidas imperfeitas e a sequência putativa da transposase apresenta os três domínios característicos conservados: DDE, HTH e CENPB. Entretanto, essa sequência está interrompida por códons de parada e não foram localizados os códons de iniciação e de terminação, sendo, portanto, provavelmente inativa. O DNA genômico de 49 diferentes isolados foi analisado por hibridização com uma sequência derivada da região interna de TCg1 e apresentaram diferentes perfis. A estratégia utilizada permitiu uma identificação eficiente de uma variedade de elementos transponíveis *Tc1-Mariner* degenerados por mutações características de RIP em *C. graminicola*. É improvável que algum dos elementos identificados seja autônomo, entretanto, esses elementos devem possuir um importante papel na variabilidade genética desse fungo. O elemento TCg1 está presente no genoma de diferentes isolados de *C. graminicola* e possui potencial para ser utilizado como marcador molecular em análises populacionais.

## ABSTRACT

BRAGA, Raíssa Mesquita, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2012. **Identification and characterization of class II transposable elements in *Colletotrichum graminicola***. Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

*Colletotrichum* is one of the most important genera of plant-pathogenic fungi in the world. The pathogenic species of this genus have hemibiotrophic lifestyle and cause diseases in several economically significant crops. Besides the economic importance, *Colletotrichum* has great significance as a model system for studying the molecular and cellular bases of fungal pathogenicity. The species *C. graminicola*, causal agent of corn anthracnose (*Zea mays*), has rare sexual stage and was the first species of the genus to have its genome completely sequenced. The transposable elements are ubiquitous and constitute a source of new mutations, being an important source of genetic variability. These elements are divided into two classes according to the presence or absence of an RNA intermediate in transposition. Elements of class I transpose via RNA intermediate, while class II elements transpose directly as DNA. The transposable elements can be applied as mutagenic agents aimed at the identification and labeling of genes and in phylogenetic and population studies. Given the importance of transposable elements in the generation of genetic variability and its applications in research, the aim of this study was to identify and characterize the class II transposable elements in the genome of *C. graminicola*. For this purpose, we used a bioinformatic approach combined with experimental activities. We identified 132 complete sequences of transposable elements in the sequenced genome of *C. graminicola*, which represent a significant proportion of the genome (0.47%). The elements were classified into six families according to similarity, all elements have characteristics of *Tc1-mariner* superfamily. Although some of these elements possess putative transposases with conserved DDE domain, all are interrupted by multiple stop codons. None of the elements identified has all the necessary features to be considered an active element. *In silico* analysis revealed evidence that these sequences are mutated by RIP (repeat point induced mutation) mechanism. TCg1 element was amplified by PCR from a Brazilian isolate and has imperfect terminal inverted repeats and the putative transposase sequence has three conserved domains characteristic of

transposases: DDE, CENPB and HTH. However, this sequence is interrupted by stop codons and lacks the initiation codon and termination codon, therefore, is probably inactive. The genomic DNA from 49 different isolates were analyzed by hybridization with a probe derived from the inner region of TCg1 and different profiles were identified. The strategy allowed the efficient identification of a variety of *Tc1-Mariner* transposable elements degenerated by mutations characteristics of RIP in *C. graminicola*. It is unlikely that any of the identified elements is autonomous, however, these elements must have an important role in the genetic variability of this fungus. The TCg1 element is present in the genomes of different isolates of *C. graminicola* and has the potential to be used as a molecular marker in population analyzes.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Elementos transponíveis são sequências de DNA que estão dispersas no genoma e se transpõem de um local para outro, apresentando, geralmente, baixa especificidade de sítio de inserção. Esses elementos são divididos em duas classes de acordo com a presença ou ausência de um intermediário de RNA na transposição. Os elementos da classe II se transpõem diretamente como DNA e possuem uma sequência que codifica uma transposase, enzima mediadora da transposição. Os elementos transponíveis são ubíquos e constituem uma das principais causas de variabilidade genética, pois a sua interação com o genoma hospedeiro gera modificações na estrutura e regulação de genes e alterações na arquitetura do genoma em geral. Os elementos transponíveis podem ser aplicados como agentes mutagênicos na pesquisa básica e como marcadores moleculares em estudos filogenéticos e populacionais.

*Colletotrichum* é um dos gêneros mais importantes de fungos fitopatogênicos em todo o mundo. As espécies fitopatogênicas desse gênero apresentam ampla variabilidade genética e causam doenças em diversas culturas economicamente importantes. Além da importância econômica, o fungo *Colletotrichum* é considerado um sistema modelo para estudos sobre o desenvolvimento e patogenicidade fúngica. A espécie *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do milho (*Zea mays*) possui ciclo sexual raro e foi a primeira espécie do gênero a ter o seu genoma completamente sequenciado. Os elementos transponíveis provavelmente são uma das principais causas de variabilidade genética encontrada no gênero *Colletotrichum*. O primeiro elemento identificado no gênero foi o elemento CgT1, integrante da classe I, em *Colletotrichum gloeosporioides*. Também foram identificados elementos em *Colletotrichum cereale*, classe I e II, e alguns foram considerados com potencial para utilização como marcadores moleculares. Tendo em vista a importância dos elementos transponíveis na geração de variabilidade genética e as suas aplicações na pesquisa, assim como a importância econômica de *C. graminicola* e como sistema modelo, este trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização de elementos transponíveis da classe II no genoma desse fungo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O fungo *Colletotrichum graminicola*

*Colletotrichum* é um dos gêneros mais importantes de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O gênero pertence ao filo Ascomycota e as suas espécies causam doenças economicamente importantes em cereais, gramíneas, legumes, vegetais e culturas perenes, incluindo árvores frutíferas. Os sintomas da doença são comumente conhecidos como antracnose, que são lesões deprimidas de formas variadas, e podem afetar a planta em todos os estágios de maturidade (BAILEY e JEGER, 1992; DICKMAN, 2000). O ciclo de vida das espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* é hemibiotrófico, com as fases biotrófica e necrotrófica ocorrendo sequencialmente. Para ocorrer a interação parasítica, uma célula especializada de infecção, o apressório melanizado, penetra a cutícula do hospedeiro e forma uma vesícula de infecção e hifas primárias. Essas estruturas não matam as células e essa fase é chamada de biotrófica. Na fase necrotrófica, são formadas hifas secundárias que matam as células (MUNCH et al., 2008).

Além da sua importância econômica, o gênero *Colletotrichum* ganhou grande relevância como um sistema modelo, pois as suas espécies fornecem excelentes modelos para o estudo das bases moleculares e celulares de patogenicidade fúngica (BAILEY et al., 1992; DICKMAN, 2000).

Entre as espécies do gênero *Colletotrichum*, encontra-se a espécie *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson, o agente causal da antracnose foliar e podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.) (MUNCH et al., 2008). *C. graminicola* possui uma curta fase biotrófica, seguida de uma fase necrotrófica (KRIJGER et al., 2008). A doença afeta todas as partes da planta e pode ocorrer em qualquer período da época de crescimento. Esse fungo é bem adaptado à sobrevivência em agroecossistemas de milho, já que é tanto patógeno de plantas vivas como saprófito facultativo de restos culturais do milho (BERGSTROM e NICHOLSON, 1999). Seu ciclo sexual (Teleomorfo *Glomerella graminicola* Politis) é raro e ainda não foi reportado no campo (CROUCH e BEIRN, 2009).

## 2.2 Elementos transponíveis

Elementos transponíveis são sequências de DNA que se movem de uma localização para outra dentro do genoma (KIDWELL, 2005). A ideia revolucionária de que os genomas possuem sequências móveis de DNA foi conceituada pela primeira vez por Barbara McClintock antes da descoberta da estrutura do DNA (CRAIG, 2002). Por cerca de 20 anos (1946 a 1966), Barbara McClintock foi a única pesquisadora a estudar os elementos transponíveis, chamados por ela de “elementos controladores” (GALUN, 2003). Ela descobriu os elementos transponíveis quando trabalhava com milho (*Zea mays*) na década de 1940. Seu trabalho baseou-se em análises de fenótipo de milho e envolveu a família Ac-Ds de elementos transponíveis. Barbara McClintock observou as mudanças dos padrões de coloração do milho nos cruzamentos e interpretou os resultados em termos de regulação da atividade gênica por algum tipo de “elemento controlador”. Esses elementos se moviam quando as células se dividiam e proliferavam, mutando os genes em apenas algumas células. As mudanças na cor eram decorrentes dos efeitos da transposição dos elementos controladores nos genes de pigmentação. A conclusão mais importante de Barbara McClintock foi a de que esses elementos possuem uma grande influência no desenvolvimento dos organismos (MCCLINTOCK, 1950, 1956; JONES, 2005; BIEMONT e VIEIRA, 2006).

Entretanto, a comunidade científica contemporânea ignorou por cerca de 25 anos o trabalho pioneiro de Barbara McClintock, até que se confirmou a existência dos elementos transponíveis por clonagem molecular (JONES, 2005). Os experimentos que confirmaram definitivamente os elementos transponíveis como constituintes do genoma foram incitados pela descoberta, na década de 1970, de que bactérias, leveduras e moscas da fruta possuíam elementos semelhantes aos estudados por Barbara McClintock (BIEMONT e VIEIRA, 2006). Os avanços nas metodologias de genética molecular abriram caminho para um vasto progresso no conhecimento dos elementos transponíveis e eles se revelaram em virtualmente todos os organismos vivos (GALUN, 2003). Além disso, com o advento do sequenciamento de DNA em larga escala, tornou-se claro que os elementos transponíveis são os componentes mais abundantes do material genético da maioria dos eucariotos (WESSLER, 2006).

Apesar dos elementos transponíveis terem sido descobertos em bactérias, plantas, animais e leveduras no período da década de 1970 até o início da década de 1980, eles foram descritos em fungos filamentosos apenas mais tardiamente (DABOUSSI e CAPY, 2003). A primeira evidência da presença de elementos transponíveis em fungos filamentosos surgiu a partir de estudos de genética convencional com mutantes da espécie *Ascobolus immersus* com coloração de esporos instável (DECARIS et al., 1978 *apud* FÁVARO et al., 2005). O primeiro elemento transponível ativo identificado e isolado em fungo filamentoso foi o elemento *Tad* de *Neurospora crassa*, que estava inserido no gene *am* (glutamato desidrogenase) (KINSEY e HELBER, 1989). Os elementos transponíveis são abundantes em fungos, em geral representam de 3 a 20% do genoma (HUA-VAN et al., 2005). Em alguns casos, é verificada uma abundância abaixo dessa média, como em *Ustilago maydis*, agente causal do carvão do milho, que possui apenas 1,1% de elementos transponíveis no genoma (KAMPER et al., 2006). Genomas sequenciados recentemente de tamanhos não usuais têm mostrado uma invasão massiva de elementos transponíveis. O genoma de *Blumeria graminis*, o agente causal do oídio do trigo, estimado em pelo menos 174 mega pares de bases, é constituído de pelo menos 85% de elementos transponíveis (PARLANGE et al., 2011). *Tuber melanosporum*, um fungo ectomicorrízico, possui um genoma de aproximadamente 125 mega pares de bases, constituído de cerca de 58% de elementos transponíveis (MARTIN et al., 2010).

A maioria dos elementos transponíveis compartilha características gerais que os diferenciam de outros tipos de sequências de DNA: estão dispersos no genoma e o seu grau de repetição varia amplamente de poucas a milhares de cópias, dependendo da família do elemento e da espécie hospedeira envolvida; geram duplicação do sítio alvo onde ocorre sua inserção, como resultado da transposição; apresentam suas extremidades caracterizadas pela presença de repetições que são tipicamente homólogas entre os membros da mesma família; carregam genes que codificam as enzimas responsáveis pela transposição (KIDWELL, 2005).

## 2.3 Classificação dos elementos transponíveis

Existem diferentes tipos de elementos transponíveis. Esses elementos podem ser divididos em grupos que compartilham aspectos comuns de estrutura e mecanismos de transposição (WATSON, 2004). Os níveis de classificação incluem (em ordem hierárquica): classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. O nível mais alto, classe, divide os elementos transponíveis pela presença ou ausência de um intermediário de transposição de RNA (WICKER et al., 2007).

Os elementos transponíveis da classe I, ou retrotransposons, se transpõem via um intermediário de RNA. O intermediário de RNA é transcrito a partir de uma cópia genômica e transcrito reversamente para DNA por uma transcriptase reversa codificada pelo elemento. Desse modo, cada ciclo de replicação produz uma nova cópia (WICKER et al., 2007).

A classe II possui duas subclasses, que são distinguidas pelo número de fitas de DNA que são clivadas durante a transposição, mas nenhuma das duas subclasses se move via um intermediário de RNA. A subclasse 1 compreende os elementos transponíveis “cliva e cola” da ordem TIR, caracterizada pelas suas repetições terminais invertidas (*Terminal inverted repeats* - TIRs) de tamanhos variados. A transposição é mediada pela enzima transposase que reconhece as TIRs e cliva ambas as fitas em cada extremidade. A subclasse 2 compreende os elementos transponíveis que sofrem um processo de transposição que confere uma replicação sem a clivagem em dupla fita. Esses elementos transponíveis “copia e cola” se transpõem pela replicação envolvendo o deslocamento de uma única fita. A classificação dessas duas subclasses dentro da classe II reflete a característica comum que é a ausência de um intermediário de RNA, porém não indica necessariamente uma ancestralidade em comum (WICKER et al., 2007).

Ambas as classes são subdivididas em superfamílias com base em características estruturais, organização interna, tamanho da duplicação do sítio-alvo gerado na inserção, e similaridades de sequência ao nível de DNA e de proteína. Podem ser destacadas quatro superfamílias principais na classe II: *Tc1-Mariner*, *hAT*, *Mutator* e *MITEs* (DABOUSSI e CAPY, 2003). A superfamília *Tc1-Mariner* é a mais abundante e é encontrada em plantas, fungos e animais. Os elementos dessa superfamília possuem cerca de 1300 a 2400 pb e possuem um único gene que codifica a transposase e é flanqueado por repetições terminais

invertidas. Suas transposases contêm um domínio DDE característico (PLASTERK et al., 1999). O domínio DDE/D contém uma tríade de aminoácidos que consiste de dois resíduos de ácido aspártico (D) e um de ácido glutâmico (E) ou um terceiro D. A estrutura tridimensional dessa tríade determina o sítio catalítico que contém dois íons metálicos divalentes e auxilia em várias reações nucleofílicas na clivagem de DNA (YUAN e WESSLER, 2011). Suas transposases também contêm um domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice (HTH) na extremidade N-terminal (PIETROKOVSKI e HENIKOFF, 1997).

Os elementos transponíveis também podem ser classificados em autônomos e não-autônomos. Os elementos autônomos são aqueles que codificam todas as sequências que capacitam a sua transposição. Os elementos não autônomos são deficientes estruturalmente em algum aspecto e dependem de proteínas produzidas por outros elementos no genoma para se moverem. Muitos elementos não autônomos são derivados de elementos autônomos que sofreram deleções de partes de suas estruturas (KIDWELL, 2005). Proteínas fornecidas por elementos autônomos podem transpor elementos não autônomos, o que geralmente ocorre quando os elementos pertencem à mesma família (DABOUSSI e CAPY, 2003).

## **2.4 Elementos transponíveis e o genoma**

Os elementos transponíveis constituem uma fonte comum de novas mutações, sendo provavelmente uma das principais causas de variabilidade genética (MILLER e CAPY, 2004). Variabilidade genética é vital para a evolução, pois fornece “novo material” sobre o qual a seleção natural pode atuar, levando à evolução (OLIVER e GREENE, 2009). A interação entre os elementos transponíveis e o genoma hospedeiro é bastante diversa, variando desde modificações na estrutura e na regulação gênica a alterações da arquitetura do genoma em geral, representando um importante papel na evolução da complexa rede genética (MILLER e CAPY, 2004).

Quando os elementos transponíveis se movem, geralmente apresentam pequena seletividade de sítios de inserção. Como resultado, podem se inserir dentro de genes, inativando completamente a função gênica. Também podem se inserir dentro de sequências regulatórias de um gene, onde a sua presença pode levar a

mudanças na expressão gênica. Além disso, os elementos transponíveis servem como substrato para os sistemas de recombinação celular por funcionarem como “regiões portáteis de homologia”. Duas cópias de um elemento transponível em diferentes localizações (mesmo em diferentes cromossomos) podem fornecer sítios para recombinação homóloga. Tais permutas resultam em deleções, inserções, inversões ou translocações (LEWIN, 2003). Portanto, os elementos transponíveis podem gerar inovações genéticas de duas principais maneiras: ativamente, o que pode ocorrer através de inserção, contribuindo diretamente com as sequências gênicas ou alterando a regulação gênica, ou via a retrotransposição de transcritos de RNA, gerando genes duplicados ou éxons; passivamente, atuando como sequências homólogas em recombinações que podem resultar em rearranjos cromossômicos, duplicações gênicas ou deleções (OLIVER e GREENE, 2009). Desse modo, na linha evolucionária, os elementos transponíveis podem ser considerados como ferramentas moleculares naturais na modelagem da organização, estrutura e função de genes e genomas (MILLER e CAPY, 2004).

O papel dos elementos transponíveis em mutações e na organização do genoma levou a avanços consideráveis na percepção dos mecanismos de mudanças genéticas em fungos filamentosos. As mudanças mediadas pelos elementos transponíveis, associadas com transposição e recombinação, fornecem uma ampla variabilidade genética, o que é útil em populações naturais na sua adaptação a pressões ambientais (DABOUSSI e CAPY, 2003).

Mudanças genéticas associadas com os elementos transponíveis podem resultar em duplicação gênica. Em *Aspergillus oryzae*, um fungo filamentoso de interesse industrial que sofreu pressão seletiva para aumento de secreção de enzimas que degradam amido, detectaram-se duplicações do gene codificador da enzima  $\alpha$ -amilase em diferentes linhagens (HUNTER et al., 2011). Essas duplicações estavam associadas com a atividade de elementos transponíveis da superfamília *Tc1-Mariner*. O elemento codifica uma transposase putativa e outra proteína putativa de função desconhecida e possui 9,1 kb com repetições terminais invertidas. Essa foi a primeira vez em que se reportou elementos *Tc1-Mariner* ativos com esse tamanho e relacionados com mudanças genéticas benéficas para o fungo.

Os elementos transponíveis também estão envolvidos na regulação de genes de fungos. Em estudos realizados com *Aspergillus nidulans* descobriram-se

evidências para o envolvimento de transposons na regulação de agrupamentos de genes do metabolismo secundário (SHAABAN et al., 2010). O agrupamento de genes relacionados à biossíntese de penicilina nesse fungo é flanqueado por repetições de DNA e por elementos transponíveis, que foram identificados como possíveis reguladores positivos desse agrupamento de genes. Também se considera a possibilidade de que esses elementos participam na evolução de agrupamentos gênicos do metabolismo secundário.

Apesar de a transposição fornecer uma variabilidade genética que pode ser benéfica ao organismo, ela deve estar sob uma rígida regulação, para evitar o acúmulo de mutações que possam ser deletérias (LABRADOR e CORCES, 1997). Existe uma variedade de mecanismos diferentes de controle da transposição. Esses mecanismos podem ser mediados pelo próprio elemento ou pelo organismo hospedeiro (KIDWELL, 2005). Algumas espécies de fungos desenvolveram mecanismos de silenciamento que são considerados como sistemas de defesa contra os elementos transponíveis (DABOUSSI e CAPY, 2003). Desse modo, a seleção natural e a evolução dos mecanismos de controle do hospedeiro asseguram que um balanço seja alcançado entre o nível tolerável de efeitos deletérios em indivíduos e um efeito benéfico em longo prazo para a linhagem (OLIVER e GREENE, 2009). É importante ressaltar que elementos ativos constituem apenas uma pequena fração dos elementos transponíveis dos genomas da maioria dos organismos (WESSLER, 2006; KIDWELL, 2005).

Em fungos filamentosos, o processo de mutação de ponto induzida por repetição (RIP) está envolvido na defesa do genoma contra elementos transponíveis móveis. Esse processo detecta eficientemente e causa mutações em sequências duplicadas. Ocorre no ciclo de vida sexual e detecta sequências duplicadas maiores que 400 pb e que compartilham mais de 80% de identidade. Essas sequências são inativadas por mutações do tipo substituições C:G para T:A (SELKER, 2002; GALAGAN e SELKER, 2004).

A transposição de alguns elementos pode ser estimulada por estresses. Ogasawara et al. (2009) descreveram a estimulação da transposição de elementos transponíveis da classe II por estresses ambientais, como choque térmico, estresse ácido, estresse oxidativo e irradiação UV. O mecanismo de estimulação da transposição por estresse ainda é desconhecido. O elemento *Crawler*, pertencente à

superfamília *Tc1-Mariner*, de *Aspergillus oryzae* mostrou ativação da transposição em condições de estresse, apesar de não apresentar transposição durante o crescimento sem estresse. Como o elemento é quiescente em condições de crescimento padrões (sem nenhum estresse), há uma indicação de que a transposição do elemento seja controlada (OGASAWARA et al., 2009).

Quanto à organização dos elementos transponíveis no genoma, acredita-se que a formação de agrupamentos de elementos (tanto da classe I como da classe II) é uma característica geral da organização de elementos no genoma de fungos, verificada em diversos estudos em diferentes fungos (HUA-VAN et al., 2000). Também se verificou a distribuição de elementos transponíveis em agrupamentos em vários outros organismos, como em *Drosophila melanogaster* e *Arabidopsis thaliana*. Entretanto, os mecanismos que levam a essa distribuição são desconhecidos (THON et al., 2006). No genoma do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, diversas famílias de elementos transponíveis analisadas estão “agrupadas” em sequências repetidas. Esses arranjos são misturas de vários tipos de elementos transponíveis, com algumas sequências frequentemente repetidas e algumas são inseridas dentro de outros elementos (HUA-VAN et al., 2000). Em *Magnaporthe oryzae*, os elementos transponíveis são amplamente restritos a três agrupamentos que são caracterizados por uma maior frequência de duplicações gênicas. Além disso, os genes dentro dos agrupamentos possuem uma grande diversidade de sequência quando comparados aos genes ortólogos de outros fungos (THON et al., 2006).

## **2.5 Importância do estudo de elementos transponíveis**

A contribuição dos elementos transponíveis para a estrutura do genoma e evolução, assim como o seu impacto na montagem e no sequenciamento genômico, tem gerado um crescente interesse nos seus métodos de análise computacional. A abordagem mais comumente utilizada para se identificar novas famílias de elementos transponíveis é baseada na detecção de similaridade de sequências codificadoras de proteínas de elementos conhecidos. Métodos que utilizam similaridade de proteínas são mais prováveis de detectar sequências fidedignas de elementos, pois se baseiam no grande número de sequências de elementos já

relatadas. Esse método detecta elementos recentemente ativos, de uma maneira que haja conservação substancial de similaridade de proteína, e não são aplicáveis na detecção de certas classes de elementos que são compostos inteiramente de sequências não codificadoras (BERGMAN e QUESNEVILLE, 2007).

O interesse na pesquisa de elementos transponíveis provém de quatro motivos principais: (1) A aplicação de elementos transponíveis como ferramentas úteis na pesquisa e na análise filogenética. Essas aplicações incluem o uso de elementos transponíveis como vetores de transformação e como marcadores eficientes em marcação de genes e em estudos filogenéticos; (2) Os elementos transponíveis, além de outros DNAs repetitivos, representam um estorvo e um aumento de custo no sequenciamento de genomas; (3) Os elementos transponíveis possuem homologia com a maquinaria de replicação de vírus, fatores de transcrição e proteínas de ligação, gerando interesse em estudos de biologia molecular estrutural; (4) As interações dos elementos transponíveis com seus hospedeiros é de interesse em estudos de biologia evolucionária (HOLMES, 2002).

Uma questão de grande importância são as aplicações práticas dos elementos transponíveis em marcação de genes e análise populacional, o que facilita a pesquisa em biologia sistemática e genômica funcional (DABOUSSI e CAPY, 2003). A sistemática baseada na análise de DNA possui a vantagem de ser independente da expressão gênica e, portanto, não variar de acordo com as condições ambientais (FREEMAN et al., 1993).

Como os elementos transponíveis são frequentemente restritos a linhagens específicas ou populações fúngicas, podem ser usados como ferramentas de diagnóstico linhagem-específica. Essa aplicação é de interesse da indústria farmacêutica, como uma maneira alternativa de caracterizar linhagens produtoras valiosas, e na fitopatologia, para identificar patógenos específicos ou populações. Estudos mostram padrões de hibridização específicos de um determinado elemento transponível em linhagens ou a presença de múltiplas cópias de um elemento em apenas uma determinada linhagem (KEMPKEN, 1999). Para que sejam adequados para o uso como marcadores, em estudos ecológicos e evolucionários, o elemento deve ser representado frequentemente no genoma, mas não deve ter potencial de excisão do seu sítio e nem estar sujeito à transferência horizontal (KIDWELL, 2005).

HE et al. (1996) isolaram o retrotransposon CgT1 de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo filamentoso patogênico causador de antracnose em *Stylosanthes* spp. Verificou-se que CgT1 possui distribuição restrita em *C. gloeosporioides*, pois isolou-se o elemento de isolados do biótipo A, mas esse elemento não foi encontrado em isolados do biótipo B. O mesmo foi observado para as espécies *C. lindemuthianum*, *C. trefilei* e *C. destructivum*. O elemento CgT1 foi o primeiro identificado no gênero *Colletotrichum* e têm potencial considerável como ferramenta para o estudo da estrutura populacional, dinâmica do genoma e evolução de *C. gloeosporioides*.

EDEL et al. (2001) utilizaram os elementos *Fot1* e *impala* para estimar a diversidade genética de *F. oxysporum* isolados de diferentes solos. Foram avaliadas as distribuições dos dois elementos no genoma dos isolados. Embora não tenha sido evidenciada nenhuma relação entre a distribuição genômica do elemento *impala* e a origem dos isolados, tal relação foi observada no caso do elemento *Fot1*.

CROUCH et al. (2008) investigaram a utilidade de quatro elementos transponíveis como marcadores moleculares para a análise de populações de *Colletotrichum cereale*. Análises de hibridização revelaram polimorfismos específicos de linhagem e padrões de distribuição dos transposons. Concluiu-se que a variabilidade e ubiquidade do transposon *Ccret2*<sup>A15</sup> no genoma de *C. cereale* permite que esse elemento possa ser usado como um marcador genético confiável para discriminar linhagens do fungo, identificar genótipos híbridos e analisar a diversidade genética nas populações.

A disponibilidade de genomas sequenciados e o crescente aumento de banco de dados têm aprimorado as pesquisas sobre elementos transponíveis em diversos aspectos, incluindo: mudanças mediadas por elementos transponíveis na estrutura e tamanho do genoma, a influência dos elementos transponíveis no genoma e nas funções gênicas, regulação de elementos transponíveis pelo hospedeiro e estudos genômicos em larga escala da atividade de elementos transponíveis. Assim, as abordagens de bioinformática se tornaram parte integral da pesquisa em larga escala sobre elementos transponíveis tanto em pesquisas envolvendo somente análises *in silico* ou como auxiliar em experimentos laboratoriais (JANICKI et al., 2011).

Dufresne et al. (2011) identificaram elementos relacionados ao elemento *pogo* no genoma sequenciado de 4 espécies de *Fusarium* através de buscas por similaridade utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) com o elemento *Fot* como padrão. A caracterização desses elementos permitiu que fosse proposto um esboço da história evolucionária dos elementos *Fot* no gênero *Fusarium*.

Em *Paracoccidioides brasiliensis*, o agente causal da micose sistêmica humana denominada paracoccidioidomicose, descreveram-se 8 novas famílias de transposons pertencentes à superfamília *Tc1-Mariner* (MARINI et al., 2010). Nesse trabalho, utilizou-se uma abordagem de bioinformática associada a experimentos laboratoriais para identificação e caracterização de elementos transponíveis nos genomas sequenciados de três linhagens filogeneticamente distintas.

O retrotransposon *Boty-II* de *Botrytis cinerea*, um fitopatogênico necrotrófico, foi identificado por análise de sequência genômica *in silico*. Duas sequências completas e duas parciais de *Boty-II* foram identificadas. As análises das características filogenéticas e estruturais sugerem uma potencial aplicação desse elemento como marcador molecular (TAN et al., 2009).

O transposon *Aft1* da superfamília *Tc1-Mariner* foi identificado no genoma de *Aspergillus fumigatus*. O algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi utilizado para se identificar sequências similares ao transposon *Tan1* no genoma sequenciado de *A. fumigatus*. *Aft1* foi caracterizado como funcional e pode oferecer uma base útil para o desenvolvimento de uma ferramenta de mutagênese, pois possui amplo espectro de hospedeiro e baixa especificidade de sítio de inserção (HEY et al., 2008).

Tendo em vista a importância dos elementos transponíveis na geração de variabilidade genética e as suas aplicações na pesquisa, assim como a importância econômica de *C. graminicola* e como sistema modelo, é importante que se realizem estudos da presença e caracterização de elementos no genoma dessa espécie. A disponibilidade do genoma sequenciado de *C. graminicola* e de banco de dados de elementos transponíveis permitem uma eficiente abordagem *in silico* nesse tipo de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CAB international, 1992, 388p.

BAILEY, J. A. et al. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: J. A. BAILEY, AND M. J. JEGER (org.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**, CAB International, Wallingford, 1992. p. 88–120.

BERGMAN, C. M.; QUESNEVILLE, H. Discovering and detecting transposable elements in genome sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 8, n. 6, p. 382-392, 2007.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease** v. 38, n. 7, p. 596-608, 1999.

BIEMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521-524, 2006.

CRAIG, N. L. Mobile DNA: an Introduction. In: CRAIG, N. L. et al. (Org.). **Mobile DNA II**. Washington: ASM press, 2002. cap.1, p. 3 – 11.

CROUCH, J. A.; BEIRN, L. A. Anthracnose of cereals and grasses. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 19-44, 2009.

CROUCH, J. A.; GLASHEEN, B. M.; GIUNTA, M. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. The evolution of transposon repeat-induced point mutation in the genome of *Colletotrichum cereale*: reconciling sex, recombination and homoplasmy in an "asexual" pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 3, p. 190-206, 2008.

DABOUSSI, M. J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 275-299, 2003.

DICKMAN, M. B. *Colletotrichum*. In: KRONSTAD, J. W. (Org.). **Fungal pathology**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000. cap. 5, p. 127-148.

DECARIS, B.; FRANCOU, F.; LEFORT, C.; RIZET, G. Unstable ascospore color mutants of *Ascobolus immersus*. **Molecular & General Genetics**, v. 162, n. 1, p. 69-81, 1978.

DUFRESNE, M.; LESPINET, O.; DABOUSSI, M. J.; HUA-VAN, A. Genome-Wide Comparative Analysis of pogo-Like Transposable Elements in Different *Fusarium* Species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 73, n. 3-4, p. 230-243, 2011.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETTE, C. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, n. 1, p. 61-71, Jun 2001.

FAVARO, L. C. L.; ARAUJO, W. L.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; AZEVEDO, J. L.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. **Mycological Research**, v. 111, n. Pt 1, p. 93-105, 2007

FREEMAN, S.; PHAM, M.; RODRIGUEZ, R. J. Molecular Genotyping of *Colletotrichum* Species Based on Arbitrarily Primed Pcr, a+T-Rich DNA, and Nuclear-DNA Analyses. **Experimental Mycology**, v. 17, n. 4, p. 309-322, 1993.

GALAGAN, J. E.; SELKER, E. U. RIP: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 9, p. 417-423, 2004.

GALUN, E. **Transposable elements: a guide to the perplexed and the novice**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, 355p.

HE, C. Z.; NOURSE, J. P.; KELEMU, S.; IRWIN, J. A. G.; MANNERS, J. M. CgT1: A non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular & General Genetics**, v. 252, n. 3, p. 320-331, 1996.

HEY, P.; ROBSON, G.; BIRCH, M.; BROMLEY, M. Characterisation of Aft1 a Fot1/Pogo type transposon of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 2, p. 117-126, 2008.

HOLMES, I. Transcendent elements: whole-genome transposon screens and open evolutionary questions. **Genome Research**, v. 12, n. 8, p. 1152-1155, 2002.

HUA-VAN, A.; DAVIERE, J. M.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. **Current Genetics**, v. 37, n. 5, p. 339-347, 2000.

HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A.; MAISONHAUTE, C.; CAPY, P. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 426-440, 2005.

HUNTER, A. J.; JIN, B.; KELLY, J. M. Independent duplications of alpha-amylase in different strains of *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 4, p. 438-444, 2011.

JANICKI, M.; ROOKE, R.; YANG, G. Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 19, n. 6, p. 787-808, 2011.

JONES, R. N. McClintock's controlling elements: the full story. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 90-103, 2005.

KAMPER, J.; KAHMANN, R.; BOLKER, M.; MA, L. J.; BREFORT, T.; SAVILLE, B. J.; BANUETT, F.; KRONSTAD, J. W.; GOLD, S. E.; MULLER, O.; PERLIN, M. H.; WOSTEN, H. A. B.; DE VRIES, R.; RUIZ-HERRERA, J.; REYNAGA-PENA, C. G.; SNETSELAAR, K.; MCCANN, M.; PEREZ-MARTIN, J.; FELDBRUGGE, M.; BASSE, C. W.; STEINBERG, G.; IBEAS, J. I.; HOLLOMAN, W.; GUZMAN, P.; FARMAN, M.; STAJICH, J. E.; SENTANDREU, R.; GONZALEZ-PRIETO, J. M.; KENNEL, J. C.; MOLINA, L.; SCHIRAWSKI, J.; MENDOZA-MENDOZA, A.; GREILINGER, D.; MUNCH, K.; ROSSEL, N.; SCHERER, M.; VRANES, M.; LADENDORF, O.; VINCON, V.; FUCHS, U.; SANDROCK, B.; MENG, S.; HO, E. C. H.; CAHILL, M. J.; BOYCE, K. J.; KLOSE, J.; KLOSTERMAN, S. J.; DEELSTRA, H. J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L.; LI, W. X.; SANCHEZ-ALONSO, P.; SCHREIER, P. H.; HAUSER-HAHN, I.; VAUPEL, M.; KOOPMANN, E.; FRIEDRICH, G.; VOSS, H.; SCHLUTER, T.; MARGOLIS, J.; PLATT, D.; SWIMMER, C.; GNIRKE, A.; CHEN, F.; VYSOTSKAIA, V.; MANNHAUPT, G.; GULDENER, U.; MUNSTERKOTTER, M.; HAASE, D.; OESTERHELD, M.; MEWES, H. W.; MAUCELI, E. W.; DECAPRIO, D.; WADE, C. M.; BUTLER, J.; YOUNG, S.; JAFFE, D. B.; CALVO, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.; BIRREN, B. W. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, v. 444, n. 7115, p. 97-101, 2006.

KIDWELL, M. G. Transposable Elements. In: Gregory, T. R (org.). **The Evolution of the Genome**, New York: Elsevier academic Press, 2005. cap. 3, p. 165-221.

KEMPKEN, F. Fungal transposons: from mobile elements towards molecular tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 756-760, 1999.

KINSEY, J. A.; HELBER, J. Isolation of a Transposable Element from *Neurospora Crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 6, p. 1929-1933, 1989.

KRIJGER, J. J.; HORBACH, R.; BEHR, M.; SCHWEIZER, P.; DEISING, H. B.; WIRSEL, S. G. R. The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 10, p. 1325-1336, 2008.

LABRADOR, M.; CORCES, V. G. Transposable element-host interactions: Regulation of insertion and excision. **Annual Review of Genetics**, v. 31, p. 381-404, 1997.

LEWIN, B. Transposons. In: \_\_\_\_\_ **Genes VIII**. Benjamin Cummings; US Ed edition. 2003. cap. 16, p. 467-492.

MARINI, M. M.; ZANFORLIN, T.; SANTOS, P. C.; BARROS, R. R.; GUERRA, A. C.; PUCCIA, R.; FELIPE, M. S.; BRIGIDO, M.; SOARES, C. M.; RUIZ, J. C.; SILVEIRA, J. F.; CISALPINO, P. S. Identification and characterization of *Tc1/mariner*-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 130, 2010.

MARTIN, F.; KOHLER, A.; MURAT, C.; BALESTRINI, R.; COUTINHO, P. M.; JAILLON, O.; MONTANINI, B.; MORIN, E.; NOEL, B.; PERCUDANI, R.; PORCEL, B.; RUBINI, A.; AMICUCCI, A.; AMSELEM, J.; ANTHOUARD, V.; ARCIONI, S.; ARTIGUENAVE, F.; AURY, J. M.; BALLARIO, P.; BOLCHI, A.; BRENNAN, A.; BRUN, A.; BUEE, M.; CANTAREL, B.; CHEVALIER, G.; COULOUX, A.; DA SILVA, C.; DENOEUDE, F.; DUPLESSIS, S.; GHIGNONE, S.; HILSELBERGER, B.; IOTTI, M.; MARCAIS, B.; MELLO, A.; MIRANDA, M.; PACIONI, G.; QUESNEVILLE, H.; RICCIONI, C.; RUOTOLO, R.; SPLIVALLO, R.; STOCCHI, V.; TISSERANT, E.; VISCOMI, A. R.; ZAMBONELLI, A.; ZAMPIERI, E.; HENRISSAT, B.; LEBRUN, M. H.; PAOLOCCI, F.; BONFANTE, P.; OTTONELLO, S.; WINCKER, P. Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1033-1038, 2010.

MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 36, n. 6, p. 344-355, 1950.

MCCLINTOCK, B. Controlling elements and the gene. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 21, p. 197-216, 1956.

MILLER, W. J.; CAPY, P. Mobile Genetic Elements as Natural Tools for Genome Evolution. In: MILLER, W. J.; CAPY, P (Org.). **Mobile Genetic Elements: Protocols and Genomic Applications**. Totowa: Humana Press, 2004. cap. 1, p. 1-20.

MUNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D. S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

OGASAWARA, H.; OBATA, H.; HATA, Y.; TAKAHASHI, S.; GOMI, K. *Crawler*, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6-7, p. 441-449, 2009.

OLIVER, K. R.; GREENE, W. K. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. **Bioessays**, v. 31, n. 7, p. 703-714, 2009.

PARLANGE, F.; OBERHAENSLI, S.; BREEN, J.; PLATZER, M.; TAUDIEN, S.; SIMKOVA, H.; WICKER, T.; DOLEZEL, J.; KELLER, B. A major invasion of transposable elements accounts for the large size of the *Blumeria graminis* f.sp. tritici genome. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 4, p. 671-677, 2011.

PIETROKOVSKI, S.; HENIKOFF, S. A helix-turn-helix DNA-binding motif predicted for transposases of DNA transposons. **Molecular & General Genetics**, v. 254, n. 6, p. 689-695, 1997.

PLASTERK, R. H. A.; IZSVAK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens - the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 8, p. 326-332, 1999.

SELKER, E. U. Repeat-induced gene silencing in fungi. **Homology Effects**, v. 46, p. 439-450, 2002.

SHAABAN, M.; PALMER, J. M.; EL-NAGGAR, W. A.; EL-SOKKARY, M. A.; HABIB EL, S. E.; KELLER, N. P. Involvement of transposon-like elements in penicillin gene cluster regulation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 5, p. 423-432, 2010.

TAN, H.; ZHAO, M.; YAN ZHOU, J.; DONG LI, Z.; WEI SONG, W.; JIU TAN, Y. Boty-II, a novel LTR retrotransposon in *Botrytis cinerea* B05.10 revealed by genomic sequence. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, 2009.

THON, M. R.; PAN, H.; DIENER, S.; PAPALAS, J.; TARO, A.; MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. The role of transposable element clusters in genome evolution and loss of synteny in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Genome Biology**, v. 7, n. 2, p. R16, 2006.

WATSON, J. D. et al. Site-Specific Recombination and Transposition of DNA In:\_\_\_\_\_ **Molecular biology of the gene**. San Francisco: Benjamin Cummings, 2004, cap.11, p. 293-342.

WESSLER, S. R. Eukaryotic transposable elements: Teaching old genomes new tricks. In: CAPORALE, L. H. (org.). **The Implicit Genome**. New York: Oxford University Press, 2006. cap. 8, p. 138-162.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

YUAN, Y. W.; WESSLER, S. R. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7884-7889, 2011.

### 3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS DA SUPERFAMÍLIA *Tc1-Mariner* EM *Colletotrichum graminicola*

#### 3.1 Resumo

Introdução: O fungo ascomiceto *Colletotrichum graminicola* é o agente causal da antracnose foliar e podridão do colmo do milho. Os elementos transponíveis são ubíquos e constituem uma importante fonte de variabilidade genética em fungos filamentosos, podendo também gerar mutações deletérias. Alguns fungos filamentosos possuem um mecanismo de defesa contra elementos transponíveis, a mutação de ponto induzida por repetição (RIP), que detecta eficientemente sequências duplicadas e as inativa por mutações.

O genoma sequenciado de *C. graminicola* e a disponibilidade de bancos de dados de elementos transponíveis permite uma eficiente abordagem na identificação e caracterização de elementos transponíveis no genoma desse fungo, o que foi o foco deste trabalho.

Resultados: A busca de elementos transponíveis da classe II completos no genoma sequenciado de *C. graminicola* levou a identificação de 133 sequências, que foram divididas em seis famílias de acordo com a identidade. Esses elementos apresentam características da superfamília *Tc1-Mariner*, são flanqueados por sítio de duplicação TA e possuem diferentes repetições terminais invertidas (TIRs) com repetições diretas internas. Algumas transposases putativas desses elementos possuem domínio DDE conservado, entretanto, todas estão interrompidas por vários códons de parada. A análise *in silico* revelou evidências de mutações geradas pelo mecanismo de RIP. O elemento TCg1, clonado a partir do isolado brasileiro 2908m, possui repetições terminais invertidas imperfeitas e sequência putativa da transposase com os três domínios característicos conservados: DDE, HTH e CENPB. Entretanto, essa sequência está interrompida por cinco códons de parada e não foi identificado códon de iniciação. O DNA genômico de diferentes isolados de *C. graminicola* foi analisado por hibridização com sequência derivada da região interna de TCg1. Todos os isolados apresentaram elementos transponíveis semelhantes a TCg1 e foram identificados diferentes perfis de hibridização.

Conclusões: *C. graminicola* possui uma variedade de elementos transponíveis *Tc1-Mariner* degenerados por mutações características de RIP. É improvável que algum dos elementos caracterizados seja autônomo no isolado sequenciado. O elemento TCg1 está presente em diferentes isolados de *C. graminicola* e possui potencial uso como marcador molecular em estudos populacionais desse fitopatógeno.

Palavras-chave: Transposon; Transposase; Gênero *Colletotrichum*; Mutação de ponto induzida por repetição; RIP.

## 3.2 Introdução

O fungo ascomiceto *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson [teleomorfo *Glomerella graminicola* (Politis)] é o agente causal da antracnose foliar e podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.) (MUNCH et al., 2008). É considerado um dos patógenos mais populares e economicamente importantes dessa cultura (BERGSTROM e NICHOLSON, 1999). Esse fungo possui ciclo de vida hemibiotrófico, caracterizado por uma curta fase biotrófica, seguida de uma fase necrotrófica (MÜNCH et al., 2008). Seu ciclo sexual é raro e ainda não foi reportado em campo (CROUCH e BEIRN, 2009). *Colletotrichum graminicola* foi a primeira espécie do gênero *Colletotrichum* a ter o seu genoma completamente sequenciado ([www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum\\_group/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group/)).

Os elementos transponíveis são ubíquos e fornecem uma ampla variabilidade genética, através de recombinação e transposição, possuindo um papel importante em mutações e organização do genoma em fungos filamentosos (DABOUSSI e CAPY, 2003). Os elementos transponíveis são classificados em duas classes, que os divide pela presença ou ausência de um intermediário de transposição de RNA. Os elementos transponíveis da classe I, ou retrotransposons, se transpõem via um intermediário de RNA. Os elementos da classe II (transposons) se transpõem via intermediário de DNA e se dividem em duas subclasses, que são distinguidas pelo número de fitas de DNA que são clivadas durante a transposição. A subclasse 1 compreende os elementos transponíveis da ordem TIR, caracterizada por repetições terminais invertidas (TIRs) de tamanhos variados. A transposição é mediada pela enzima transposase que reconhece as TIRs e cliva ambas as fitas em cada extremidade (WICKER et al., 2007).

A subclasse 1 possui diversas superfamílias conhecidas, que são distinguidas entre si pelas TIRs e pelo tamanho da duplicação do sítio alvo (WICKER et al., 2007). Entre estas, a superfamília *Tc1-Mariner* é a mais abundante. Os elementos dessa superfamília possuem cerca de 1300 a 2400 pb, geram duplicação de sítio alvo TA e possuem um único gene que codifica a transposase e é flanqueado por repetições terminais invertidas. Suas transposases contêm um domínio DDE característico (PLASTERK et al., 1999). Esse domínio contém uma tríade de aminoácidos que consiste de dois resíduos de ácido aspártico (D) e um de ácido

glutâmico (E) ou um terceiro resíduo de ácido aspártico (D). A estrutura tridimensional dessa tríade determina o sítio catalítico que coordena dois íons metálicos divalentes e auxilia em várias reações nucleofílicas na clivagem de DNA (YUAN e WESSLER, 2011). Suas transposases também contêm um domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice (HTH) na extremidade N-terminal que reconhece as TIRs (PIETROKOVSKI E HENIKO, 1997). O domínio de ligação ao centrômero (CENPB), encontrado em proteínas centroméricas de mamíferos e transposases eucarióticas, também está envolvido com o reconhecimento das repetições terminais invertidas (HEY et al., 2008).

Apesar de poderem gerar características benéficas, a presença de elementos transponíveis no genoma pode gerar mutações deletérias. Assim, alguns organismos possuem mecanismos de defesa que atuam na inativação de elementos transponíveis. Alguns fungos filamentosos possuem o mecanismo de mutação de ponto induzida por repetição (RIP) ou mecanismos *RIP-like*, que detecta eficientemente e causa mutações em sequências duplicadas. RIP ocorre no ciclo de vida sexual e atua em sequências duplicadas maiores que 400 pb e que compartilham mais de 80% de identidade. Essas sequências são inativadas por mutações do tipo substituições C:G para T:A (GALAGAN e SELKER, 2004; SELKER, 2002; CLUTTERBUCK, 2011). A proteína RID (*RIP defective*), uma DNA metiltransferase descrita em *Neurospora crassa*, foi a primeira enzima identificada como componente essencial do mecanismo de RIP (FREITAG et al., 2002).

A disponibilidade de genomas sequenciados e o crescente aumento de banco de dados têm aprimorado as pesquisas sobre elementos transponíveis, tornando a abordagem de bioinformática parte integral dessas pesquisas (JANICKI et al., 2011). Dufresne et al. (2011) identificaram elementos transponíveis no genoma sequenciado de 4 espécies de *Fusarium* através de buscas de similaridade utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) com o elemento *Fot* como padrão. Em *Paracoccidioides brasiliensis*, descreveram-se 8 novas famílias de transposons pertencentes à superfamília *Tc1-Mariner* (MARINI et al., 2010). Nesse trabalho, utilizou-se uma abordagem de bioinformática associada a experimentos laboratoriais para identificação e caracterização de elementos transponíveis nos genomas sequenciados de três linhagens filogeneticamente distintas.

No gênero *Colletotrichum* já foram identificados os transposons *Collect1* e *Collect2* em *C. cereale* por hibridização diferencial para identificação de DNA repetitivo (CROUCH et al., 2008) e também alguns retrotransposons, como: CgT1 (He et al., 1996) e Cgret (ZHU e OUDEMANS, 2000) em *C. gloeosporioides* e *RetroCl1* em *C. lindemunthianum* (SANTOS et al., 2011), utilizando a mesma abordagem.

Este trabalho apresenta a identificação e caracterização de 6 famílias de elementos transponíveis *Tc1-Mariner* por análise *in silico* do genoma de *C. graminicola*. O transposon TCg1, sequenciado a partir de um isolado obtido no Brasil, mostrou potencial para ser utilizado como marcador molecular em análises populacionais. Todos os transposons identificados apresentam evidências de mutações geradas pelo mecanismo de RIP, mostrando a importância desse mecanismo para a inativação de transposons em *C. graminicola*.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Identificação de transposons no genoma de *C. graminicola*

Na pesquisa realizada no banco de dados utilizando-se palavras-chave relacionadas a transposase foram encontradas quatro sequências abertas de leitura (ORFs) que codificam proteínas similares às transposases da superfamília *Tc1-Mariner* já identificadas em outros organismos. Duas ORFs, que codificam proteínas de 176 e 242 aminoácidos, resultaram em diversos *hits* (12 e 67, respectivamente) quando utilizadas em busca de identidade (utilizando-se o algoritmo BLAST com parâmetros padrões) contra a sequência do genoma de *C. graminicola*. A partir desses resultados, foram identificadas 45 sequências completas (com extremidades flanqueadoras repetidas invertidas) correspondentes aos elementos *Tc1-Mariner*.

A análise pelo programa RepeatMasker revelou uma proporção de 3,06% de sequências repetitivas no genoma. Apenas 0,5% do genoma correspondeu a elementos transponíveis (0,41% de retrotransposons e 0,09% de transposons).

No total foram identificados 133 elementos completos (Anexo 1). Entretanto, nenhum desses elementos apresentou ORFs completas. Todas as sequências codificadoras putativas de transposase estavam interrompidas por códons de parada e frequentemente desprovidas de códon de iniciação.

O conteúdo GC dos elementos teve uma média de 29,5%, em contraste com o conteúdo GC do genoma, que foi de 49,1%. O elemento com a sequência de aminoácidos putativa da transposase mais conservada (com menor número de códons de parada internos) apresentou o maior conteúdo GC: 48,4%.

Os elementos foram divididos em seis famílias. Para a classificação em famílias foi considerada a definição proposta por Wicker et al. (2007), onde se considera que dois elementos pertencem a mesma família se compartilharem 80% ou mais de identidade em pelo menos 80% da região codificadora ou região interna, ou nas regiões terminais invertidas, ou em ambos. Essa abordagem foi dificultada devido à degeneração da sequência dos elementos. Então, um elemento foi inserido em uma família mesmo quando não apresentava 80% ou mais de identidade com todos os membros, apenas com alguns. Assim, os representantes de cada família compartilham entre si de 65 a 99% de identidade, sendo que dentro de uma família

cada elemento apresenta mais de 80% de identidade com pelo menos mais outro elemento dessa família (Tabela 1).

**Tabela 1-** Abundância de transposons *Tc1-Mariner* identificados e classificados em novas famílias no genoma de *C. graminicola*.

<b>Família <i>Tc1-Mariner</i></b>	<b>Quantidade de elementos</b>
TCg1	45
TCg2	39
TCg3	23
TCg4	16
TCg5	3
TCg6	7
<b>Total</b>	<b>133</b>

Todos os elementos apresentam sítio alvo de duplicação TA e TIRs que variam de 43 a 51 pb (Figura 1). As TIRs possuem repetições diretas internas (com exceção da família TCg6), que variam de 12 a 17 pb. Na análise da região interna, apresentam similaridade com transposases *Tc1-Mariner* de outros fungos filamentosos, entretanto, poucos possuem domínios característicos conservados (DDE, HTH e CENPB). Apenas as famílias TCg1 e TCg3 apresentam elementos com domínio DDE conservado completo (Figura 2). Na família TCg1, o terceiro resíduo do domínio DDE consiste de um ácido aspártico (D) e na família TCg3 o terceiro D foi substituído por uma leucina (L).

A família TCg1 possui maior abundância (45 elementos identificados) e foi subdividida em três subfamílias: TCg1.1, TCg1.2 e TCg1.3 (27, 13 e cinco elementos, respectivamente), de acordo com as sequências das TIRs, que apresentaram uma clara diferença entre os membros dessa família (Figura 1). O elemento TCg1.1\_8 dessa família possui 1837 pb, TIRs perfeitas de 44 pb e região putativa da transposase com menor número de códons de parada internos (12) e com domínio DDE conservado. A região interna desse elemento apresenta 77% de identidade (E-value = 0,0) com o transposon *Collect2* de *Colletotrichum cereale* (Anexo 2.1).

Elemento	Sequência	Tamanho
<i>TCg1.1_8</i>	ACTCCCCACCCCTATATCCGAGCCACCCCGCATCCGAGCCACC	44pb
<i>TCg1.2_33</i>	ACTCCCCACCCAC <sup>*</sup> ATCCGAGACACCCCCAC <sup>*</sup> TTCGAGACAT	43pb
<i>TCg1.3_3</i>	ACTCAAATACCCCGCTT <sup>*</sup> CTGCACCA <sup>*</sup> CCCCGCTTT <sup>*</sup> TGCACCA <sup>*</sup> C	43pb
<i>TCg2_434</i>	ACGTATATAATAAGTAAGCGCGCTAGATAAGTAAGCGCGCTAC	43pb
<i>TCg3_24</i>	AGTCAAACACTACCCACTTTCCGCCACCCCTGCATTCCGCCACC	44pb
<i>TCg4_31</i>	ACGTACCTATATAGTA <sup>*</sup> GCAGGCTATTATAGTA <sup>*</sup> GCAGGCTACTT	45pb
<i>TCg5_1</i>	AGACCCACCCCTATAACGGGCCAC <sup>*</sup> CCCCTATAACGGGCCAC <sup>*</sup>	43pb
<i>TCg6_85</i>	CGGAGGTGCGCGTCAAAAGTCATGATCCATAGTGCCAAGACCACCCCTG	50pb

**Figura 1- Repetições terminais invertidas (TIRs) dos elementos TCg.** Comparação das estruturas das TIRs dos elementos das diferentes famílias *Tc1-Mariner* encontradas no genoma de *C. graminicola*. As setas abaixo das sequências indicam as repetições diretas internas e os asteriscos indicam nucleotídeos polimórficos entre repetições.

A família TCg2 é a segunda mais abundante (39 elementos) e apresenta elementos com menor conteúdo GC, com média de 22,9% (variando de 17,1 a 30,9%). O elemento mais conservado (TCg2\_434) possui 1862 pb, TIRs de 43 pb e região putativa da transposase com 40 códons de parada internos. Sua região nucleotídica interna compartilha 64% de identidade (E-value = 2e-26) com o transposon *DAHLIAE1a* de *Verticillium dahliae*, um ascomiceto fitopatogênico (Anexo 2.2).

O elemento TCg3\_64 de 1888 pb pertencente a família TCg3 é o único que apresentou os domínios conservados HTH e CENPB além do DDE. A sequência putativa da transposase de TCg3\_64 possui 28 códons de parada internos e apresenta 51% de similaridade (E-value = 1e-168) com a transposase de *DAHLIAE2* de *Verticillium dahliae* (Anexo 2.3).

A família TCg4 também apresenta baixo conteúdo GC (média de 23,2%). Seu elemento mais conservado (TCg4\_31) possui 1860 pb, TIRs de 45 pb com repetições diretas de 16 pb e região putativa da transposase com aproximadamente 50 códons de parada e sem domínios conservados.

```

TCg1.1_8      -IHPSNRNIDKGTGIIIEGRGGNGLVIGSKASQYIQKKQPGSR-AVSIISKYISAASSSLPPL
TCg1.2_33    ----SNRNIDKTSIIIEGKGVNRLVIGSVTSYIK--KCPGS--AVSIISKMSAARSSLPPL
TCg1.3_3     -----NIDKTSIIIEGRGSNRLVIGSLESQHI--KQLGS--AISLIKYSANKRSICLL
TCg3_64      IKLANRYNMDETGILEGRGDNGLVIGRAETNLVRRKKQPGSRVAVSIISKISAKGIPIYPL
TCg3_85      INLANRYNIDKTSILKGRGNNRLVIGRAIT-AVRKKQPRRA-VSIISKYISTKGNFTYPL
OPHI01      ILPQNRWNMDETGFSMGQDPLYVLGTAQTKIRKKQMGSRWTSTVEICISATGKSLPPL
Flipper      IKPENRWNMDEAGIIIEGOGLNGMVLGSSKRRFIQKKQPGSRTWTSTFIEICISATGRALLPL

TCg1.1_8      VIYKPKSLQAWFPSNLNIYKPR-ETATNNTTDN-TALEWLEKVFILRTKPT-PEEARL
TCg1.2_33    LIYKPKSLAFISNLSNLSRYKA--EIVTDNSITNN-TTLK-LEEVFILYTRPA-LEEARL
TCg1.3_3     VIYKPKSIAWF--LSNLLRYKEH-ETYSNNSITNN-TALK-LEKVFILLTPT-LEEARL
TCg3_64      VIYKPK--KVQWFPLDLSLYKGEFIVENRWTTNATAVK-IERVFLP-TKPS--PNARL
TCg3_85      VIYKPK--KV--FSFNLLNYR-EFIIKNR-TTNNTTVK-LERVFLP-TKPS--PNARL
OPHI01      IIFKPKSVQQWFPADLNPYSSWQETATNNGWSDNETGLKWLKDFIPCSTPMRPSDARL
Flipper      VIFKPKTLQQWFPIKLDNYEGWEEATDNGWTTDSTGLEWLKEVFIPQSAPTRPKEARL

TCg1.1_8      LVLNGHSHITIDFMWQCQ-HNIYLLFLPPHASAVLQPLDMAVFGLLKQAYRKEVRYLDN
TCg1.2_33    LVLNRYYSYITINFIKY---YYIYLLFLLHTSTVL-PLDIAVFSLLKQAYYR-VRYLDN
TCg1.3_3     LILDRHYSYITIKFIQYQ--HYIYLLFLLHSSAVL-PLDVAVFSLLKQAYCR-VRYLDN
TCg3_64      LILDRHRSYITTFDILYI--NNVYLLFLPHTSYIL--LLNVVFSLIKAAYYKELRYLIN
TCg3_85      LILDKYKSYIIIEFILIYI--NNVYLLFLPLYTSYIL--LLNLVFSLIKAVYRKKLGYSI
OPHI01      LVLDPGHGSHDSDFEMKLCFENNIYLLFLPAHASVVLQPLDLTVFSLKGYFRKEMEKVST
Flipper      LVLDPGHGSHETTFMLECCKNIHLLFLPHTSHVLPQPDLSIFSPKKEYRYHLNTLDS

TCg1.1_8      WVTDSTVAGKKAFLCYFKAREA-----
TCg1.2_33    -VIDLTVTSKRAFLECYFKA-----
TCg1.3_3     -VTDLTIASKRAFLECYFKARKAAITSKNISSGRSAGLPICIRRPLSNSIVTK
TCg3_64      ---NLTIIKRNFI-ICYKAY-ARITISNIKSG---
TCg3_85      ---NSIIIGKKNFISYYYKAYLARLTISNIKSS-----
OPHI01      -DDASVVCNKRTFIKSYSIARTAAALTSQNIIRSGW-----
Flipper      -LADSTPIDKRNFLACYQKARKALKALTLRNITSGW-----

```

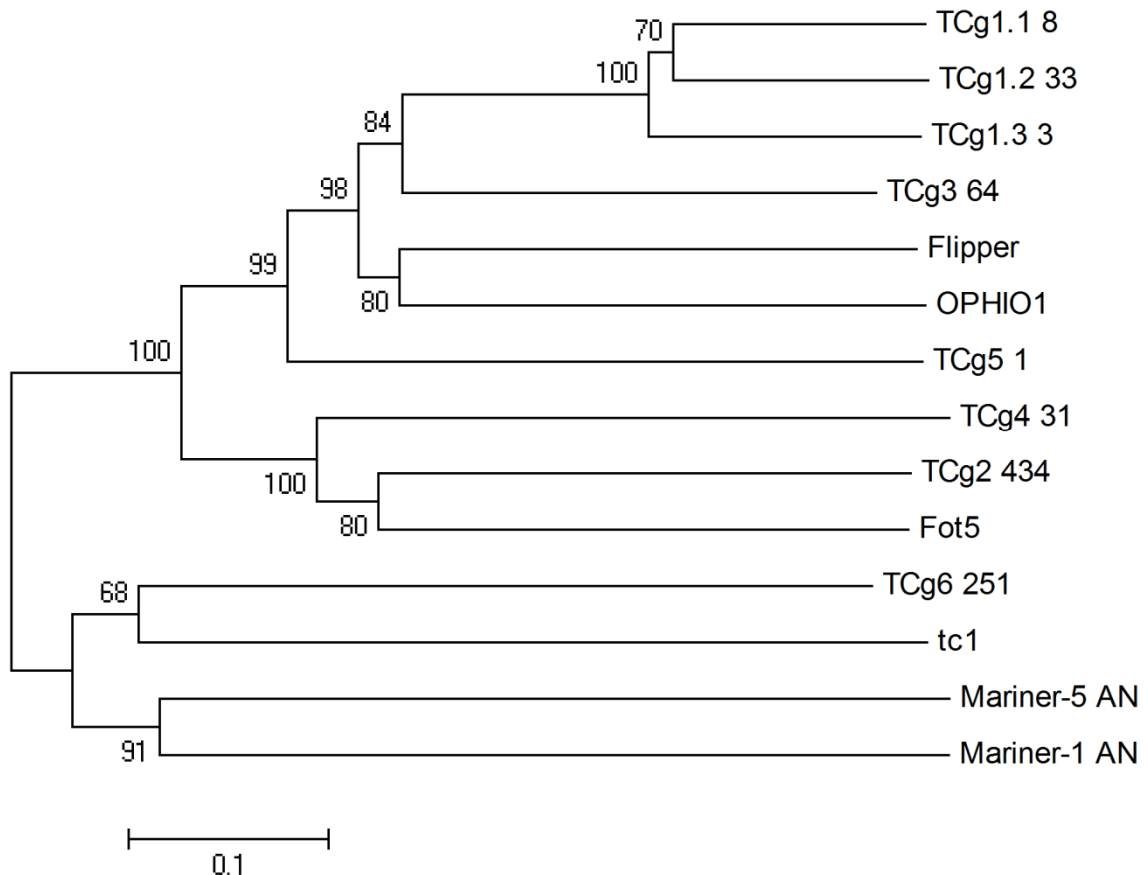
**Figura 2- Comparação do domínio DDE da transposase putativa de elementos TCg com transposases fúngicas relacionadas.** Alinhamento ClustalW do domínio conservado DDE de TCg1.1\_8, TCg1.2\_33, TCg1.3\_3 (subfamílias de TCg1), TCg3\_64 e TCg3\_85 (família TCg3) com os domínios DDE dos elementos *OPHI01* de *Ophiostoma ulmi* e *Flipper* de *Botrytis cinerea*. Os resíduos de aminoácidos conservados estão realçados em preto (resíduos idênticos), em cinza escuro (substituições conservadas) e em cinza claro (substituições semi-conservadas). A tríade DDD está realçada em amarelo.

A família TCg5 possui apenas três representantes que compartilham de 81 a 87% de identidade. TCg5\_1 possui 1945 pb, TIRs de 43 pb com repetições diretas de 17pb. Sua região putativa da transposase possui 54 códons de parada internos e domínios HTH e DDE incompletos.

Não foram identificadas repetições diretas nas TIRs da família TCg6. Os membros dessa família são muito defectivos e apresentam cerca de 50 códons de paradas na região putativa da transposase. TCg6\_251 possui 1717 pb, TIRs de 50 pb.

A análise filogenética usando a sequência de aminoácidos da sequência putativa das transposases dos elementos mais conservados dividiu as famílias em

três grupos principais, um grupo contendo as famílias TCg1, TCg3 e TCg5, outro contendo as famílias TCg2 e TCg4 e por fim a família TCg6 divergente dos outros grupos (Figura 3).



**Figura 3- Filogenia dos elementos TCg e transposases relacionadas de outros fungos.** Árvore filogenética da sequência de aminoácidos putativa dos elementos TCg e de diferentes elementos transponíveis.

### 3.3.2 Local de inserção dos transposons

A análise da região de inserção (1500 pares de bases a montante e a jusante ao transposon) mostrou que alguns transposons estão inseridos em regiões que apresentam similaridade com proteínas transposase e transcriptase reversa. Indicando, provavelmente, regiões de agrupamento de elementos transponíveis.

Em uma região no supercontig 136, duas sequências completas de transposons, TCg3\_136 e TCg4\_136, estão separadas entre si por uma sequência de 2041 pb cuja sequência de aminoácidos correspondente possui 40% de

similaridade com a proteína transcriptase reversa de um retrotransposon de *Aspergillus kawachii* (GenBank: GAA93096.1).

No supercontig 314, dois transposons, TCg2\_314 e TCg5\_314, encontram-se separados por uma sequência de apenas 213 pb e na região a montante de TCg2\_314 encontra-se uma sequência de 339 pares de bases que codifica para um sequência de aminoácidos que possui 49% de similaridade com a transposase de um elemento *Mutator-like* de *Metarhizium anisopliae* (GenBank: EFZ03338.1).

Dois transposons, TCg1.1\_98.1 e TCg1.1\_98.2, encontram-se separados por 2939 pb no supercontig 98. Nessa região encontra-se uma ORF de 1728 pb que codifica para uma proteína de 529 aminoácidos classificada como uma prostaciclina sintase (Supercontig 98: 59657-61384 -; GenBank: EFQ36497.1) e está localizada a apenas 6 pb a jusante de TCg1.1\_98.1. Na região a montante a 1196pb de TCg1.1\_98.1 é encontrada uma ORF de 1770 nucleotídeos que codifica para uma proteína de 589 aminoácidos que possui 27% de similaridade com a transposase do elemento *Crypt1* de *Cryphonectria parasitica* (GenBank: AAF97810.1), um transposon pertencente a superfamília hAT da classe II. Além disso, o transposon TCg1.1\_98.2 é flanqueado por regiões que apresentam similaridade com transposases tc1.

Também foram identificados transposons inseridos em regiões muito próximas a ORFs de genes: TCg1.2\_56 se localiza a 98 pb a montante da ORF de Amidase (Supercontig 56: 32950-34612 +; GenBank: FR667752.1); TCg1.3\_23 se localiza a 62 pb a jusante da ORF de Transportador ABC (Supercontig 23: 175927-181265 +; GenBank: EFQ31083.1); TCg1.1\_45 se localiza a 192 pb a jusante da ORF de Citocromo B5-like (Supercontig 45: 276617-279724 -; GenBank: EFQ33994.1); TCg1.2\_142 se localiza a 196 pb a montante da ORF de Citocromo P450 (Supercontig 142: 21617-23409 -; GenBank: EFQ36698.1); TCg1.2\_3 se localiza a 86 pb a montante da ORF de Epóxido hidrolase (Supercontig 3: 1038851-1040217 -; GenBank: EFQ26064.1); TCg2\_162 se encontra a 213 pb a jusante da ORF "*KR domain-containing protein*" (Supercontig 162: 2698-10998 -; GenBank: EFQ36730.1); TCg3\_46 se localiza a 411 pb a jusante da ORF de Transportador MFS (Supercontig 46: 293615-295436 -; GenBank: EFQ34113.1) e a 527 pb a montante de TCg3\_46 encontra-se TCg1.1\_46; TCg1.1\_7 encontra-se a 294 pb a montante da ORF de GMC oxidoreductase (Supercontig 7: 936805-939084 +;

GenBank: EFQ27442.1). Em um caso extremo, parte do transposon TC1.1\_70 (186pb da extremidade 3') foi considerada como parte do gene Tricodieno oxigenase (Supercontig 70: 151789-153788 -; GenBank: EFQ35814.1), provavelmente devido a proximidade.

Em alguns casos, a sequências dos transposons encontra-se inserida dentro de ORFs: TCg3\_24 encontra-se inserido dentro da ORF do gene Citocromo P450 (Supercontig 24: 137630-141409 +; GenBank: EFQ31242.1); TCg3\_6.2 encontra-se inserido dentro da ORF do gene Transportador alfa glucosidase (GenBank: FR667752.1); TCg1.1\_83 encontra-se inserido dentro da ORF do gene Transportador de hexose (GenBank: FR667726.1).

### 3.3.3 Análise de RIP

Na análise realizada pelo programa RIPCAL foram utilizadas as 45 sequências de elementos da família TCg1. O elemento TCg1.1\_8 foi utilizado como referência nas análises, pois apresentou maior conteúdo GC. O número de mutações do tipo transição foi maior que o número de transversões e a maioria dos desvios dessa sequência foram transições do tipo C para T e G para A.

As transições em C:G não ocorrem de maneira aleatória nas sequências mutadas, alguns dinucleotídeos CpN são preferencialmente mutados em relação a outros (HANE e OLIVER, 2008). Nessa análise, foi contado o número de ocorrências das possibilidades de dinucleotídeos que poderiam ser alvo de RIP. As mutações ocorreram com mais frequência no dinucleotídeo CpA (mutações CpA para TpA ou TpG para TpA), havendo, portanto uma preferência pelo dinucleotídeo CpA.

São utilizados dois índices principais para se evidenciar RIP:  $TpA/ApT$  e  $(CpA + TpG)/(ApC + GpT)$ . O primeiro índice avalia a frequência dos produtos de RIP, enquanto o segundo avalia a frequência dos seus alvos. Altos valores de  $TpA/ApT$  e baixos valores de  $(CpA + TpG)/(ApC + GpT)$  são fortes indicativos de RIP (HANE e OLIVER, 2008). Nessa análise, o índice  $TpA/ApT$  foi de 1,64 e o índice  $(CpA + TpG)/(ApC + GpT)$  foi de 0,56, condizente com mutações de RIP.

No genoma sequenciado de *C. graminicola* foi identificada uma ORF de 1253 nucleotídeos (Anexo 3) que codifica para uma proteína de 750 resíduos de aminoácidos que possui o domínio de DNA metiltransferase (DMT) característico de

RID. A sequência de aminoácidos desse domínio compartilha 52% de similaridade com a sequência de aminoácidos do domínio DMT da proteína RID de *Neurospora crassa* (Figura 4). A identificação dessa proteína relacionada com o mecanismo de RIP também corrobora a possibilidade da existência desse mecanismo em *C. graminicola*.



**Figura 4- Comparação do domínio DMT da DNA metiltransferase identificada no genoma de *C. graminicola* com o domínio DMT da proteína RID de *N. crassa*.** Alinhamento ClustalW das sequências de aminoácidos dos domínios DMT da DNA metiltransferase identificada no genoma de *C. graminicola* (Supercontig 5: 84970-87222 –; número de acesso no GenBank: EFQ26585.1) com o domínio DMT da proteína RID de *N. crassa* (número de acesso no GenBank: AAM27408.1). Os resíduos de aminoácidos conservados estão realçados em preto (resíduos idênticos), em cinza escuro (substituições conservadas) e em cinza claro (substituições semi-conservadas).

### 3.3.4 Transposon TCg1

O transposon TCg1 foi amplificado a partir de DNA genômico de *C. graminicola* 2908m utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores baseados nas TIRs de TCg1.1\_8 (Anexo 4). TCg1 possui 1866 pb e TIRs imperfeitas de 44pb com repetições diretas de 12 pb, também imperfeitas (Figura 5). A sequência putativa da transposase codifica para 532 resíduos de aminoácidos e possui os três domínios característicos conservados considerados essenciais para a transposição: HTH (*Helix-turn-helix*), CENPB (*Centromere binding domain*) e DDE (Figura 6). A tríade DDD também está presente. Entretanto, a sequência está interrompida por cinco códons de parada internos e não foram identificados os códons de iniciação e

terminação. TCg1 possui 78% de identidade (E-value = 0,0) com *Collect2* de *C. cereale* (Anexo 2).

Elemento	Seqüência	Tamanho
TCg1	ACTCCCCACCCCTATATCCGACTCAC <sup>*</sup> CCCCATATCCGA <sup>*</sup> CCAT <sup>*</sup> C	44pb

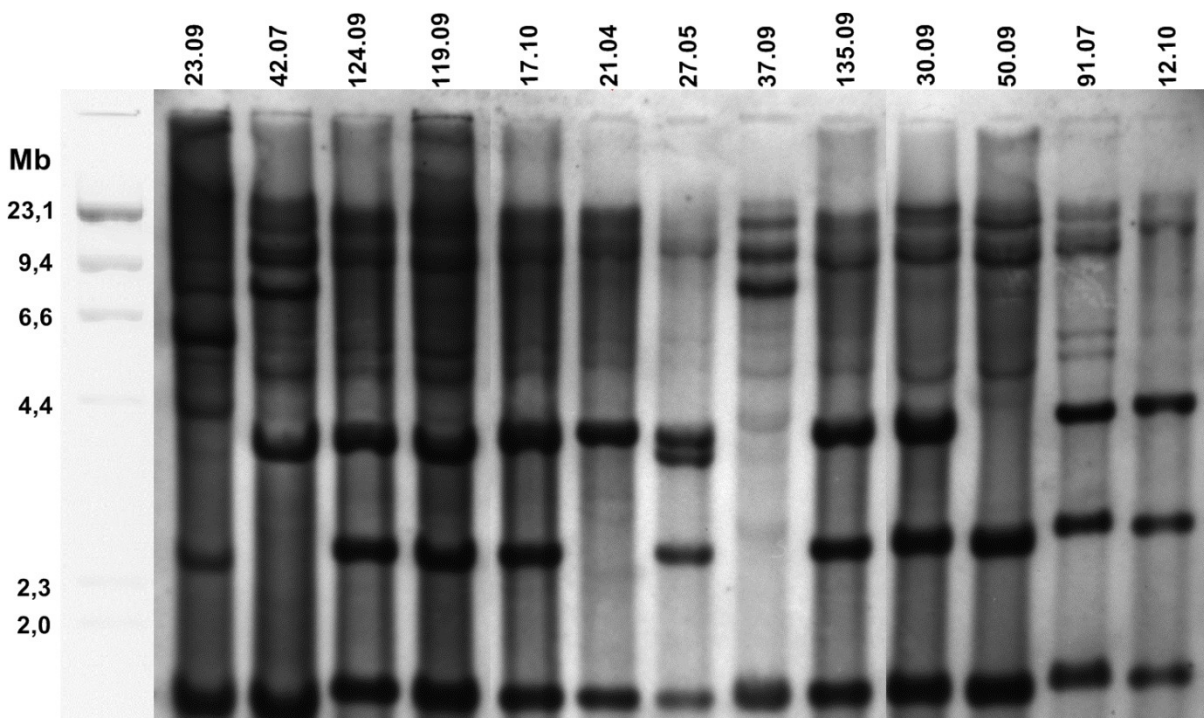
**Figura 5- Repetição terminal invertida (TIR) de TCg1.** As setas abaixo das seqüências indicam as repetições diretas internas e os asteriscos indicam nucleotídeos polimórficos entre repetições.

Flipper	MTKPYDEDDIAPALFATAGGMSVRKACSEYGTERTT LHNRMNGHLSHKFGAQLQFIAPV	60
OPHIO1	-MHDYTEDDLQPAI NAVKNNISERDASKOYGVFSTIPSRVCGSKPRSI AFQSFQHLSEA	59
TCg1	I IKOYIENEVHRALLDILDGYSIRAAADKNGLEYP TIRHRYHGRQSRSTAFIHRQHLF-I	59
Flipper	QERALANWILVQEA LGTSP THROIRELGESILNLEGGDLSLGKRWIHSFLERNP EIKTR	120
OPHIO1	QETRLANWIIICGTLGRPPTH SQKAVAASLIGASAGEKVI GKNWLD AFLRRNPSIKVQR	119
TCg1	QEYKLVAHICLQCSLGR-PLAVYQVKGLAERMMD--GQQRIGRKKWRRFLRRNPSIGTR	116
Flipper	OYKIDNARINGATTEIISKFEKID-LPAIKHKPENRWMMDEAGIIEGG LINGMVLGSS	179
OPHIO1	SKSIDSKRVNGASTDIKSWFQCLD-IPEIKNILPONRWMMDETGF SMGQDPLYVLGTA	178
TCg1	SRAIDAWRWAAHQPEVIQDFEHCLGSI AAIQDIHPSN-WMMDETGIMEGAGANGIVLGSA	175
Flipper	KRRFIKKKQPGSRWTSTIECISATGRALLPLVIEKGGIQQQWFPIKLDNYEGWFEETAT	239
OPHIO1	QKTKIEKKQMGSRAWTSTIECISATGKSLPPLIIEKGSVQQQWFPADINPMS SWOFTAT	238
TCg1	ASRYIEKKQPGSRAWISIECVADGRSLOPVVIEKGSI-T-WFLSNLSRYDGHFIYF	233
Flipper	DNGWITDSTGLEWLKEVFI PQSAETRPKEARLLVLDCHGSHETTQFMLECFKNHLLFL	299
OPHIO1	NNGWSDNETGLKWLKDFI PCSTEMRPSDARLLVLDCHGSHDSDEFMKLCFENNIYLLFL	298
TCg1	YNGWITDRDALEWLEKVFILGIMEEDSDAARLLVLDPHQSHISVD FEMKCNQHQIYLLFL	293
Flipper	PPHTSHVLQPPDL SIFSPKKEVRYHINTLDS-LADSTPIDKRNFLAC YQKARLKALTLR	358
OPHIO1	PAHASVVLQPLDLTVF SLLKGYERKEMKVST-DDASVVCNKRTFIKSYSIARTAAITSQ	357
TCg1	PPHSAVLQPLLVAVYGLLKQSYCKEVGCLDDWITDSTIAGKGAFL ECHLKARGASITIH	353
Flipper	NITSGWIASGLWPQNRAPLISRLILENSNQ--EVVYQNEV--SDDDPELQWNIHSSFIA	414
OPHIO1	NIRSGWRTAGLWPRNVLRLMSPFVLSDDNQ PSTPVQNTIIRFSSRAISEYPIRTYPSV	417
TCg1	NIKAGWVITGLWPFVSMRRLSSSLVSKASSQPSQPSQPSQPSQQQPSQQWDEAVSIVP	413
Flipper	WKTPOKGSDIRKYADIMEKVDET--DIPTRRLLFRKIOKGPDAKD YELVQSKKRIKOLEQ	472
OPHIO1	WETPKKSTDL SRQVQFNQEQET--SISSR-HFFCKIRKGFDEKLDLLASQKRRIEEIEA	474
TCg1	WSTPRRSADLRHQLHQMGQLVADGIDIH TYRHLSKVKQKGYDEEAYEKALLARQNDALRA	473
Flipper	KLEETIPKRRMVKTSPNSRFAGIEATYQAQIEAGDREIEIKDSDSIYETDITGDCIEVE	532
OPHIO1	IVDGLQVRK KKKVITISPNSKFAIWHVQRSQIAAGESVTAIEGSS--DEED-----	523
TCg1	QLEDLQSRK KKKVPLSPNSAFVNI GDVQRAENPDAGRIDSPDESSASELSSEAESCIWV-	532

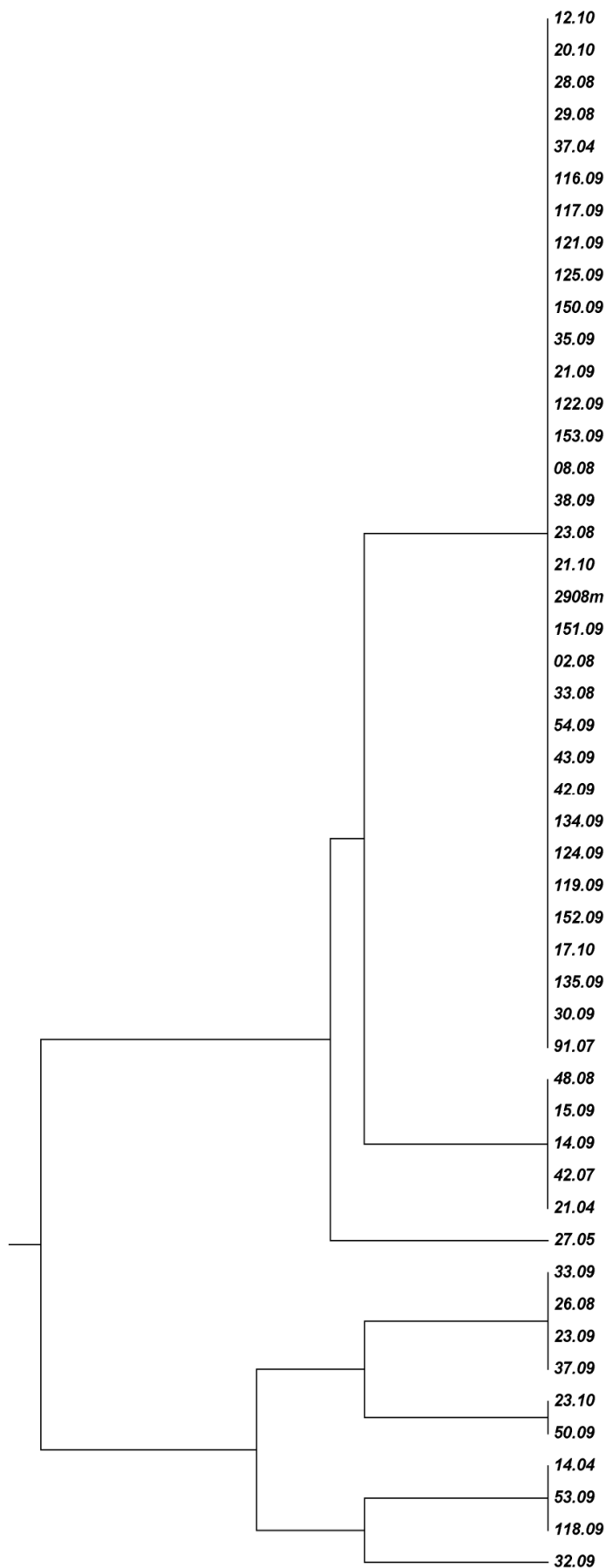
**Figura 6- Comparação do domínio DDE da transposase putativa do elemento TCg1 com transposases fúngicas relacionadas.** Alinhamento ClustalW de TCg1 com os domínios DDE dos elementos *Flipper* de *Botrytis cinerea* e *OPHIO1* de *Ophiostoma ulmi*. Os resíduos de aminoácidos conservados estão realçados em preto (resíduos idênticos), em cinza escuro (substituições conservadas) e em cinza claro (substituições semi-conservadas). A tríade DDD está realçada em amarelo. Os domínios conservados estão sombreados em azul (HTH), verde (CENPB) e rosa (DDE).

A análise de hibridização, em condições de alta estringência, do DNA genômico de vários isolados de *C. graminicola*, com a sonda derivada da região interna de TCg1, revelou diferentes perfis de hibridização, sendo que um dos perfis foi predominante (Figura 7). Todos os 49 isolados analisados hibridizaram com a sonda. Foram observadas que quatro bandas apresentaram forte sinal de hibridização com a sonda, indicando grande identidade. Outras bandas mais fracas foram detectadas, indicando a presença de cópias mais divergentes da sequência da sonda utilizada.

A partir dos perfis das quatro bandas de hibridização mais fortes foi construído um dendrograma (Figura 8). As linhagens foram separadas em sete grupos, um dos grupos englobou a maioria das linhagens (67%).



**Figura 7- Diferentes perfis de hibridização em condições de alta estringência da sonda de 963pb derivada da região interna de TCg1 com o DNA genômico clivado com *EcoRI* dos vários isolados de *C. graminicola*.** O DNA genômico total de 49 isolados de *Colletotrichum graminicola* foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI*, transferido para membrana de náilon e hibridizado com uma sonda derivada da região interna de TCg1. Todos os DNAs dos isolados hibridizaram com a sonda. As bandas mais fortes indicam grande identidade entre a sonda e o alvo.



**Figura 8- Dendrograma da análise de hibridização em diferentes isolados de *C. graminicola*.** Dendrograma construído a partir dos resultados da análise de hibridização do DNA genômico clivado de 49 isolados de *C. graminicola* utilizando-se a região interna do transposon TCg1 como sonda.

### 3.4 Discussão

A proporção de elementos transponíveis estimada pela análise do programa RepeatMasker no genoma de *C. graminicola* (0,5%) é considerada baixa quando comparada às proporções encontradas nos genomas de outros fungos, nos quais geralmente os elementos transponíveis representam de 3 a 20% do genoma (HUA-VAN et al., 2005). Entretanto, em alguns casos, é verificada uma abundância fora dessa faixa: 1,1% em *Ustilago maydis* (KAMPER et al., 2006) e até 58% em *Tuber melanosporum* (MARTIN et al., 2010) ou 85% em *Blumeria graminis* (PARLANGE et al., 2011).

Deve se ressaltar que o resultado do programa subestimou essa proporção, pois os transposons identificados neste estudo corresponderam a 0,47% do genoma (uma porcentagem relevante do genoma), enquanto que o programa identificou apenas 0,09% de transposons de DNA. Possivelmente, isto é devido à degeneração dos elementos, o que dificulta a sua identificação no genoma. É provável que o genoma de *C. graminicola* tenha uma proporção de elementos transponíveis bem maior que 0,5%.

A degeneração dos elementos completos sugere a presença de algum mecanismo de defesa do hospedeiro contra a atividade de elementos transponíveis, provavelmente o mecanismo de RIP. O baixo conteúdo GC dos elementos transponíveis, considerado baixo em relação ao conteúdo GC do genoma, também sugere a presença desse mecanismo.

Alguns elementos apresentam TIRs perfeitas e com repetições diretas perfeitas internas, entretanto, a maioria possui TIRs imperfeitas. As repetições diretas internas nas TIRs são envolvidas no reconhecimento e ligação dos domínios da transposase (BIGOT et al., 2005). A degeneração dos elementos também refletiu na baixa frequência de domínios característicos conservados. Apenas duas famílias possuem elementos com domínios conservados, as outras famílias apresentam elementos bastante degenerados, com regiões putativas das transposases interrompidas por mais de 40 códons de parada. Nenhum elemento possui as características necessárias para ser considerado autônomo.

A análise filogenética mostrou uma maior proximidade entre as famílias TCg1 e TCg3. A família TCg6 provavelmente tem uma origem diferente ou divergiu muito cedo do elemento que deu origem às outras famílias.

A análise de RIP revelou que a maioria dos desvios da sequência de referência foram transições do tipo C para T e G para A, condizente com mudanças provocadas por RIP. Os valores dos índices  $TpA/ApT$  e  $(CpA + TpG)/(ApC + GpT)$  obtidos também são condizentes com a presença do mecanismo de RIP.

Foi observado que a maioria das transições detectadas foram do tipo mutações CpA para TpA. Acredita-se que a preferência por transições CpA para TpA aumenta a chance de introduzir códons de parada TAA e TAG, levando a inativação gênica (MONTIEL et al., 2006), o que é uma possível explicação para os diversos códons de parada interrompendo as transposases dos elementos identificados.

Evidências de RIP já haviam sido relatadas em *C. graminicola* por meio da análise de sequências do retrotransposon *Gypsy*, que mostraram baixo conteúdo GC e transições características de RIP (CLUTTERBUCK et al., 2011). Em *C. cereale*, uma espécie relacionada, também foram encontradas evidências de RIP. Sequências do retrotransposon *Ccret2* apresentaram índice  $TpA/ApT$  de 2,00 e índice  $(CpA + TpG)/(ApC + GpT)$  de 0,44 (CROUCH et al., 2008).

Apesar de *C. graminicola* raramente apresentar ciclo sexual na natureza, esses resultados indicam que: o processo de RIP ocorre, provavelmente em eventos raros, ou ocorre em *C. graminicola* um mecanismo semelhante a RIP e independente do ciclo sexual.

Embora não haja indicações de atividade desses elementos em *C. graminicola*, não pode ser descartada a possibilidade de haver alguma cópia ativa em uma linhagem de campo, que ainda não tenha sofrido o mecanismo de mutação. Mesmo estando inativos, os elementos transponíveis também podem gerar variabilidade genética de maneira passiva, funcionando como regiões de homologia para recombinação, que podem resultar em rearranjos cromossômicos, duplicações gênicas ou deleções (OLIVER e GREENE, 2009). Assim, essas famílias de elementos inativos provavelmente possuem um papel na variabilidade genética de *C. graminicola*.

O transposon TCg1 possui os três domínios característicos conservados considerados essenciais para a transposição, além da tríade DDD que coordena os íons metálicos na catálise. Entretanto, esse elemento é provavelmente inativo, pois sua transposase putativa está interrompida por 5 códons de parada internos. Além disso, possui TIRs imperfeitas com repetições diretas também imperfeitas, o que provavelmente impediria o seu reconhecimento pela transposase.

TCg1 possui alta identidade (78%) com *Collect2* de *C. cereale*. *Collect2* foi caracterizado com baixo conteúdo GC e com ORF interrompida por códons de parada, provavelmente mutada por RIP (CROUCH et al., 2008). Essas duas espécies são bastante relacionadas filogeneticamente (CROUCH et al. 2006), o que indica que TCg1 e *Collect2* possivelmente possuem uma origem comum. É provável que TCg1 seja um integrante antigo do genoma de *C. graminicola*. Não foi observada uma relação entre a região de origem dos isolados e o perfil de hibridização, o que indica que provavelmente esse elemento é antigo nas linhagens analisadas. O dendrograma separou as linhagens em sete grupos, revelando um potencial uso de TCg1 em estudos populacionais desse fitopatôgeno.

### 3.5 Conclusões

A estratégia utilizada neste estudo resultou em uma identificação eficiente de elementos transponíveis no genoma de *C. graminicola*, permitindo a identificação de seis famílias *Tc1-Mariner*. *Colletotrichum graminicola* possui uma variedade de elementos transponíveis *Tc1-Mariner* degenerados com características de sequências afetadas por RIP: transições C para T e G para A, com preferência de mutações CpA para TpA, e baixo conteúdo GC. Não foram identificadas sequências com todas as características necessárias para um elemento autônomo, portanto, é improvável que algum dos elementos identificados seja autônomo. Entretanto, esses elementos provavelmente possuem um papel na variabilidade genética desse fungo, de maneira passiva, funcionando como regiões de homologia para recombinação. O elemento TCg1 está presente em diferentes isolados de *C. graminicola* e possui potencial para ser utilizado como marcador molecular em estudos populacionais. A presença de sequências de TCg1 e o perfil de hibridização devem ser analisados em outras espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum*.

## 3.6 Metodologia

### Análise bioinformática

Foi realizada uma pesquisa baseada em palavras-chave específicas relacionadas aos elementos transponíveis da classe II (transposase e transposon) no banco de dados do projeto de sequenciamento do genoma de *C. graminicola* - *Colletotrichum* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). O genoma também foi analisado pelo programa RepeatMasker version open-3.3 (<http://www.repeatmasker.org/>), que identifica cópias de elementos por análise contra uma biblioteca de elementos conhecidos. As sequências encontradas foram subsequentemente utilizadas em busca de identidade utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) contra o genoma sequenciado.

As sequências resultantes (juntamente com 1000pb das sequências flanqueadoras a jusante e a montante) foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W - Multiple Sequence Alignment (THOMPSON et al., 1994), para se identificar as extremidades do elemento transponível. Para se determinar as TIRs, as sequências foram analisadas por busca de identidade contra elas mesmas utilizando-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Por fim, as sequências completas, que continham repetições invertidas flanqueadoras, foram analisadas quanto aos produtos gênicos putativos codificados contra o banco de dados de proteínas do NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As árvores filogenéticas das sequências de aminoácidos alinhadas por ClustalW foram construídas utilizando-se o método Neighbor-joining pelo programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) com valores de bootstrap de 5000 replicatas. As sequências de transposases de outros fungos utilizadas estão disponíveis em <http://www.girinst.org/repbase/>. As sequências de aminoácidos das transposases dos elementos *OPHIO1*, *Flipper*, *Fot5* e *tc1* também foram utilizadas (números de acesso no GenBank: ABG26270.1, AAB63315.1, CAE55867.1 e XP\_002146479.1, respectivamente). Esses elementos são pertencentes, respectivamente, aos fungos *Ophiostoma ulmi*, *Botryotinia fuckeliana*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium marneffe*.

O local de inserção dos transposons no genoma sequenciado de *C. graminicola* foi verificado por análise da sequência a montante e a jusante do transposon abrangendo 3000pb no total (excluiu-se a duplicação do sítio alvo) por busca de similaridade utilizando-se o algoritmo BLASTx contra o banco de dados do NCBI.

Para análise de dinucleotídeos e cálculo de índices de RIP foi utilizado o programa RipCal (HANE e OLIVER, 2008). A sequência da proteína RID de *Neurospora crassa* (número de acesso no GenBank: AAM27408.1) foi utilizada em busca por similaridade utilizando-se o algoritmo BLAST contra o genoma.

### Isolados de *C. graminicola* e condições de cultivo

Os 49 isolados de *C. graminicola* foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. Os isolados foram cultivados em meio Batata Dextrose Agar (BDA) a 22°C.

Tabela 2- Relação de isolados de *Colletotrichum graminicola* utilizados nesse estudo.

Isolado	Localidade	Isolado	Localidade
14.04	Xanxerê – SC, Brasil	50.09	Cascavel - PR, Brasil
21.04	Campo Mourão - PR, Brasil	53.09	Cascavel - PR, Brasil
37.04	Colombia - SP, Brasil	54.09	Cascavel - PR, Brasil
27.05	Andradas - MG, Brasil	116.09	Irai de Minas - MG, Brasil
42.07	Passo Fundo - RS, Brasil	117.09	Irai de Minas - MG, Brasil
91.07	Xapecó - SC, Brasil	118.09	Irai de Minas - MG, Brasil
02.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	119.09	Irai de Minas - MG, Brasil
08.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	121.09	Irai de Minas - MG, Brasil
23.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	122.09	Irai de Minas - MG, Brasil
26.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	124.09	Irai de Minas - MG, Brasil
28.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	125.09	Irai de Minas - MG, Brasil
29.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	134.09	Jataí - GO, Brasil
33.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	135.09	Jataí - GO, Brasil
48.08	Sete Lagoas - MG, Brasil	150.09	Jaciara - MT, Brasil
21.09	Campo Mourão - PR, Brasil	151.09	Jaciara - MT, Brasil
23.09	Campo Mourão - PR, Brasil	152.09	Jaciara - MT, Brasil
30.09	Campo Mourão - PR, Brasil	153.09	Jaciara - MT, Brasil
32.09	Campo Mourão - PR, Brasil	14.09	Campo Mourão - PR, Brasil
33.09	Campo Mourão - PR, Brasil	15.09	Campo Mourão - PR, Brasil
35.09	Campo Mourão - PR, Brasil	12.10	Vilhena - RO, Brasil
37.09	Campo Mourão - PR, Brasil	17.10	Vilhena - RO, Brasil
38.09	Campo Mourão - PR, Brasil	20.10	Vilhena - RO, Brasil
42.09	Campo Mourão - PR, Brasil	21.10	Vilhena - RO, Brasil
43.09	Campo Mourão - PR, Brasil	23.10	Vilhena - RO, Brasil
2908m	-		

## **Extração de DNA**

O micélio dos isolados foi macerado em nitrogênio líquido e a extração de DNA total foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Specht et al. (1982).

## **Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR**

Foi construído um oligonucleotídeo iniciador (5'ACTCCCCACCC TATATCCG 3') com base nas extremidades repetidas invertidas do elemento mais conservado identificado na análise bioinformática. A amplificação de PCR foi realizada em termociclador PTC-100-MJ Research em reações de volume final de 50µL, contendo: 40ng de DNA; 100 µM de cada dNTP; 1 µM do oligonucleotídeo; 1x thermophilic DNA poly Buffer (Promega); 2mM de MgCl<sub>2</sub>; uma unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega). As condições de amplificação foram: 40 ciclos constituídos de uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 48°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto e com um passo de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e um de extensão final a 72°C por 10 minutos.

## **Clonagem e sequenciamento**

Os produtos de PCR foram purificados, clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega), transformados em células de *Escherichia coli* DH5α ultracompetentes e sequenciados (3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems).

## **Análise por hibridização**

O DNA genômico total de diferentes isolados foi completamente clivado com a enzima de restrição *EcoRI* e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos foram transferidos do gel para uma membrana de náilon (Amersham) de acordo com protocolos padrões (SAMBROOK et al., 1989). A marcação, hibridização e detecção da sonda foram realizadas com os *kits* (Roche) PCR DIG Probe Synthesis kit e DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II, de acordo com as instruções do fabricante. A sonda de 963pb utilizada foi derivada da região interna do elemento sequenciado e as condições de hibridização foram de alta

estringência. Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o programa POPGENE (YEH et al., 1999).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease** v. 38, n. 7, p. 596-608, 1999.

BIGOT, Y.; BRILLET, B.; AUGE-GOUILLOU, C. Conservation of Palindromic and Mirror Motifs within Inverted Terminal Repeats of *mariner*-like Elements. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 1, p. 108-116, 2005.

CLUTTERBUCK, A. J. Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 306-326, 2011.

CROUCH, J. A.; GLASHEEN, B. M.; GIUNTA, M. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. The evolution of transposon repeat-induced point mutation in the genome of *Colletotrichum cereale*: reconciling sex, recombination and homoplasmy in an "asexual" pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 3, p. 190-206, 2008.

CROUCH, J. A.; BEIRN, L. A. Anthracnose of cereals and grasses. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 19-44, 2009.

DABOUSSI, M. J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 275-299, 2003.

DUFRESNE, M.; LESPINET, O.; DABOUSSI, M. J.; HUA-VAN, A. Genome-Wide Comparative Analysis of pogo-Like Transposable Elements in Different *Fusarium* Species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 73, n. 3-4, p. 230-243, 2011.

FREITAG, M.; WILLIAMS, R.L.; KOTHE, G.O.; SELKER, E.U. A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 8802-8807, 2002.

GALAGAN, J. E.; SELKER, E. U. RIP: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 9, p. 417-423, 2004.

HANE, J. K.; OLIVER, R. P. RIPCAL: a tool for alignment-based analysis of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 478, 2008.

HE, C. Z.; NOURSE, J. P.; KELEMU, S.; IRWIN, J. A. G.; MANNERS, J. M. CgT1: A non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular & General Genetics**, v. 252, n. 3, p. 320-331, 1996.

HEY, P., ROBSON, G., BIRCH, M., BROMLEY, M. Characterisation of *Aft1* a *Fot1/Pogo* type transposon of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal genetics and biology**, v. 45, n. 2, p. 117-126, 2008.

HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A.; MAISONHAUTE, C.; CAPY, P. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 426-440, 2005.

JANICKI, M.; ROOKE, R.; YANG, G. Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 19, n. 6, p. 787-808, 2011.

KAMPER, J.; KAHMANN, R.; BOLKER, M.; MA, L. J.; BREFORT, T.; SAVILLE, B. J.; BANUETT, F.; KRONSTAD, J. W.; GOLD, S. E.; MULLER, O.; PERLIN, M. H.; WOSTEN, H. A.; DE VRIES, R.; RUIZ-HERRERA, J.; REYNAGA-PENA, C. G.; SNETSELAAR, K.; MCCANN, M.; PEREZ-MARTIN, J.; FELDBRUGGE, M.; BASSE, C. W.; STEINBERG, G.; IBEAS, J. I.; HOLLOMAN, W.; GUZMAN, P.; FARMAN, M.; STAJICH, J. E.; SENTANDREU, R.; GONZALEZ-PRIETO, J. M.; KENNEL, J. C.; MOLINA, L.; SCHIRAWSKI, J.; MENDOZA-MENDOZA, A.; GREILINGER, D.; MUNCH, K.; ROSSEL, N.; SCHERER, M.; VRANES, M.; LADENDORF, O.; VINCON, V.; FUCHS, U.; SANDROCK, B.; MENG, S.; HO, E. C.; CAHILL, M. J.; BOYCE, K. J.; KLOSE, J.; KLOSTERMAN, S. J.; DEELSTRA, H. J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L.; LI, W.; SANCHEZ-ALONSO, P.; SCHREIER, P. H.; HAUSERHAHN, I.; VAUPEL, M.; KOOPMANN, E.; FRIEDRICH, G.; VOSS, H.; SCHLUTER, T.; MARGOLIS, J.; PLATT, D.; SWIMMER, C.; GNIRKE, A.; CHEN, F.; VYSOTSKAIA, V.; MANNHAUPT, G.; GULDENER, U.; MUNSTERKOTTER, M.; HAASE, D.; OESTERHELD, M.; MEWES, H. W.; MAUCELI, E. W.; DECAPRIO, D.; WADE, C. M.; BUTLER, J.; YOUNG, S.; JAFFE, D. B.; CALVO, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.; BIRREN, B. W. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, v. 444, n. 7115, p. 97-101, 2006.

MARINI, M. M.; ZANFORLIN, T.; SANTOS, P. C.; BARROS, R. R.; GUERRA, A. C.; PUCCIA, R.; FELIPE, M. S.; BRIGIDO, M.; SOARES, C. M.; RUIZ, J. C.; SILVEIRA, J. F.; CISALPINO, P. S. Identification and characterization of *Tc1/mariner*-like DNA

transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics**, v. 11, p. 130, 2010.

MARTIN, F.; KOHLER, A.; MURAT, C.; BALESTRINI, R.; COUTINHO, P. M.; JAILLON, O.; MONTANINI, B.; MORIN, E.; NOEL, B.; PERCUDANI, R.; PORCEL, B.; RUBINI, A.; AMICUCCI, A.; AMSELEM, J.; ANTHOUARD, V.; ARCIONI, S.; ARTIGUENAVE, F.; AURY, J. M.; BALLARIO, P.; BOLCHI, A.; BRENNNA, A.; BRUN, A.; BUEE, M.; CANTAREL, B.; CHEVALIER, G.; COULOUX, A.; DA SILVA, C.; DENOEUDE, F.; DUPLESSIS, S.; GHIGNONE, S.; HILSELBERGER, B.; IOTTI, M.; MARCAIS, B.; MELLO, A.; MIRANDA, M.; PACIONI, G.; QUESNEVILLE, H.; RICCIONI, C.; RUOTOLO, R.; SPLIVALLO, R.; STOCCHI, V.; TISSERANT, E.; VISCOMI, A. R.; ZAMBONELLI, A.; ZAMPIERI, E.; HENRISSAT, B.; LEBRUN, M. H.; PAOLOCCI, F.; BONFANTE, P.; OTTONELLO, S.; WINCKER, P. Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1033-1038, 2010.

MONTIEL, M. D.; LEE, H. A.; ARCHER, D. B. Evidence of RIP (repeat-induced point mutation) in transposase sequences of *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 6, p. 439-445, 2006.

MUNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D. S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

OLIVER, K. R.; GREENE, W. K. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. **Bioessays**, v. 31, n. 7, p. 703-714, 2009.

PARLANGUE, F.; OBERHAENSLI, S.; BREEN, J.; PLATZER, M.; TAUDIEN, S.; SIMKOVA, H.; WICKER, T.; DOLEZEL, J.; KELLER, B. A major invasion of transposable elements accounts for the large size of the *Blumeria graminis* f.sp. tritici genome. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 4, p. 671-677, 2011.

PIETROKOVSKI, S.; HENIKOFF, S. A helix-turn-helix DNA-binding motif predicted for transposases of DNA transposons. **Molecular & General Genetics**, v. 254, n. 6, p. 689-695, 1997.

PLASTERK, R. H. A.; IZSVAK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens - the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 8, p. 326-332, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

SANTOS, L. V.; QUEIROZ, M. V.; SANTANA, M. F.; SOARES, M. A.; BARROS, E. G.; ARAÚJO, E. F.; LANGIN, T. Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using *RetroCl1* sequences. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011.

SELKER, E. U. Repeat-induced gene silencing in fungi. **Homology Effects**, v. 46, p. 439-450, 2002.

SPECHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, R. C. A Method for Extracting High-Molecular-Weight Deoxyribonucleic-Acid from Fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE**: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada. 1999.

YUAN, Y. W.; WESSLER, S. R. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7884-7889, 2011.

ZHU, P. L.; OUDEMANS, P. V. A long terminal repeat retrotransposon *Cgret* from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. **Current Genetic**, v. 38, n. 5, p. 241-247, 2000.

**ANEXO 1:** Sequências completas de transposons *Tc1-Mariner* identificadas na análise de bioinformática com a respectiva localização no genoma de *Colletotrichum graminicola* M1.001-Broad Institute.

Nome	Família	Localização no genoma
TCg1.1_2	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 2: 1585679- 1587474 -
TCg1.1_7	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 7: 934405- 936525 -
TCg1.1_8	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 8: 979002- 980776 -
TCg1.1_9	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 9: 21598- 23396 -
TCg1.1_12	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 12: 957663- 959461 -
TCg1.1_13	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 13: 45358- 47135 -
TCg1.1_15	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 15: 784467-786255 +
TCg1.1_21	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 21: 421817- 423696 +
TCg1.1_23	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 23: 326746- 328625 +
TCg1.1_24	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 24: 253783-255671 +
TCg1.1_34	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 34: 180660- 182527 -
TCg1.1_45	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 45: 274650- 276439 -
TCg1.1_46	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 46: 289050- 290813 -
TCg1.1_47	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 47: 180097-181871 -
TCg1.1_53	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 53: 211141- 213008 +
TCg1.1_58	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 58: 8288- 10141 +
TCg1.1_70	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 70: 150192- 151988 +
TCg1.1_78	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 78: 13490-15254 -
TCg1.1_80	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 80: 63481- 65270 -
TCg1.1_83	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 83: 31659-33436 -
TCg1.1_87	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 87: 17606- 19212 -
TCg1.1_98.1	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 98: 57908- 59662 -
TCg1.1_98.2	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 98: 63424- 65288 +
TCg1.1_101	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 101: 45599- 47466 +
TCg1.1_102	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 102: 7512- 9310 -
TCg1.1_174	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 174: 12818- 14697 -
TCg1.1_226	TCg1 (subfamília 1)	Supercontig 226: 6356-8154 -
TCg1.2_1	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 1: 887343-889248 +
TCg1.2_3	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 3: 1040290- 1042174 -
TCg1.2_7	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 7: 195833-197965 +
TCg1.2_20	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 20: 5286-7171 +
TCg1.2_23	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 23: 160688- 162556 -
TCg1.2_30	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 30: 474068- 475953 -
TCg1.2_33	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 33: 35647- 37532 +
TCg1.2_56	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 56: 30980- 32865 +
TCg1.2_62	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 62: 241814 -243755 -
TCg1.2_80	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 80: 27794- 29676 -
TCg1.2_81	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 81: 70756-72636 -
TCg1.2_102	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 102: 11593-13980 -
TCg1.2_142	TCg1 (subfamília 2)	Supercontig 142: 23592- 25477 +
TCg1.3_3	TCg1 (subfamília 3)	Supercontig 3: 508110- 509876 +
TCg1.3_23	TCg1 (subfamília 3)	Supercontig 23: 181403- 183176 -
TCg1.3_25	TCg1 (subfamília 3)	Supercontig 25: 571382- 573146 -

<b>Nome</b>	<b>Família</b>	<b>Localização no genoma</b>
TCg1.3_45	TCg1 (subfamília 3)	Supercontig 45: 301841- 303591 +
TCg1.3_174	TCg1 (subfamília 3)	Supercontig 174: 4940- 6713 +
TCg2_5	TCg2	Supercontig 5: 7349-9205 -
TCg2_23	TCg2	Supercontig 23: 248635-250500 +
TCg2_25	TCg2	Supercontig 25: 39244-41102 -
TCg2_31	TCg2	Supercontig 31: 488764-490626 +
TCg2_33	TCg2	Supercontig 33: 67468-69304 -
TCg2_36	TCg2	Supercontig 36: 163530-165394 -
TCg2_38	TCg2	Supercontig 38: 429514-431375 +
TCg2_45	TCg2	Supercontig 45: 393892-395728 -
TCg2_47	TCg2	Supercontig 47: 384020-385857 +
TCg2_69	TCg2	Supercontig 69: 155701-157562 +
TCg2_78	TCg2	Supercontig 78: 10454- 12311 -
TCg2_85	TCg2	Supercontig 85: 11753-13612 +
TCg2_101.1	TCg2	Supercontig 101: 25329-26702 +
TCg2_101.2	TCg2	Supercontig 101: 34770-36622 +
TCg2_110	TCg2	Supercontig 110: 47721-49581-
TCg2_137.1	TCg2	Supercontig 137: 6793-8466 +
TCg2_137.2	TCg2	Supercontig 137: 17139-18998 -
TCg2_159	TCg2	Supercontig 159: 1148-3008 +
TCg2_162	TCg2	Supercontig 162: 877-2376 +
TCg2_180	TCg2	Supercontig 180: 16717-18578 -
TCg2_189	TCg2	Supercontig 189: 8145-10006 +
TCg2_192	TCg2	Supercontig 192: 4298-6163 +
TCg2_198	TCg2	Supercontig 198: 764-2623 -
TCg2_231	TCg2	Supercontig 231: 1102-2942 -
TCg2_263	TCg2	Supercontig 263: 8835-10695 +
TCg2_270	TCg2	Supercontig 270: 3635-5117 +
TCg2_271	TCg2	Supercontig 271: 1454-3078 +
TCg2_272	TCg2	Supercontig 272: 7641-9497 -
TCg2_277.1	TCg2	Supercontig 277: 1621-3392 -
TCg2_277.2	TCg2	Supercontig 277: 8024-9884 -
TCg2_284	TCg2	Supercontig 284: 7952-9812 +
TCg2_285	TCg2	Supercontig 285: 1281-2749 +
TCg2_296	TCg2	Supercontig 296: 8372-10230 +
TCg2_314	TCg2	Supercontig 314: 2554-4411 +
TCg2_319	TCg2	Supercontig 319: 7218-9079 +
TCg2_373	TCg2	Supercontig 373: 2144-4005 -
TCg2_384	TCg2	Supercontig 384: 5024-6868 +
TCg2_412	TCg2	Supercontig 412: 504-2366 -
TCg2_434	TCg2	Supercontig 434: 2349-4210 -
TCg3_1	TCg3	Supercontig 1: 1330221-1332314 +
TCg3_2	TCg3	Supercontig 2: 236127-238003 +
TCg3_6.1	TCg3	Supercontig 6: 308237-310114 +
TCg3_6.2	TCg3	Supercontig 6: 403091-404829 +
TCg3_19	TCg3	Supercontig 19: 86179-88058 +
TCg3_23	TCg3	Supercontig 23: 189115-190991 +
TCg3_24	TCg3	Supercontig 24: 138870-140755 +
TCg3_32	TCg3	Supercontig 32: 360182-362061 +

<b>Nome</b>	<b>Família</b>	<b>Localização no genoma</b>
TCg3_46	TCg3	Supercontig 46: 291327-293203 +
TCg3_55	TCg3	Supercontig 55: 116566-118445 +
TCg3_56	TCg3	Supercontig 56: 1704-3443 +
TCg3_64	TCg3	Supercontig 64: 183247-185134 +
TCg3_78.1	TCg3	Supercontig 78: 79231-81106 +
TCg3_78.2	TCg3	Supercontig 78: 86355-88235 +
TCg3_85	TCg3	Supercontig 85: 2817-4565 +
TCg3_86	TCg3	Supercontig 86: 11003-12879 +
TCg3_114	TCg3	Supercontig 114: 7194-9086 +
TCg3_131	TCg3	Supercontig 131: 12475-14216 +
TCg3_143.1	TCg3	Supercontig 143: 9818-11603 +
TCg3_143.2	TCg3	Supercontig 143: 20320-22198 +
TCg3_136	TCg3	Supercontig 136: 7707-9604 +
TCg3_157	TCg3	Supercontig 157: 10266-12145 +
TCg3_206	TCg3	Supercontig 206: 9279-11158 +
TCg4_31	TCg4	Supercontig 31: 113578-115437 +
TCg4_58	TCg4	Supercontig 58: 13321-15161 +
TCg4_76	TCg4	Supercontig 76: 142903-144757 -
TCg4_84	TCg4	Supercontig 84: 10952-12607 -
TCg4_99	TCg4	Supercontig 99: 46491-48148 -
TCg4_120.1	TCg4	Supercontig 120: 16562-17868 -
TCg4_120.2	TCg4	Supercontig 120: 27499-29701 -
TCg4_121	TCg4	Supercontig 121: 8178-10038 +
TCg4_125	TCg4	Supercontig 125: 24371-26155 -
TCg4_131	TCg4	Supercontig 131: 30184-32023 +
TCg4_136	TCg4	Supercontig 136: 3822-5665 +
TCg4_172	TCg4	Supercontig 172: 19507-21391 +
TCg4_176	TCg4	Supercontig 176: 293-2150 +
TCg4_203	TCg4	Supercontig 203: 5823-7466 +
TCg4_331	TCg4	Supercontig 331: 7694-9214 +
TCg4_386	TCg4	Supercontig 386: 996-2945 -
TCg5_1	TCg5	Supercontig 1: 1375205-1377149 +
TCg5_209	TCg5	Supercontig 209: 3374-5365 -
TCg5_314	TCg5	Supercontig 314: 4630-6622 +
TCg6_9	TCg6	Supercontig 9: 649176-650868 +
TCg6_16	TCg6	Supercontig 16: 831375-833174 +
TCg6_22	TCg6	Supercontig 22: 119774-121466 +
TCg6_85	TCg6	Supercontig 85: 6909-8794 +
TCg6_101	TCg6	Supercontig 101: 3991-5631 +
TCg6_170	TCg6	Supercontig 170: 6301-7941 +
TCg6_251	TCg6	Supercontig 251: 4593-6309 +





```

Query 1065 CCTCTAACAAATAATATATAGCAGGACGCTATAACTAGACA----AACTAATAGCCTAAAT 1120
          |||  || |  ||| |  || |||||  || || |  || |||  ||| ||  ||
Sbjct 755 CCTGCGACCACGATAAACGGCGGGACGC----ACCAGCCTTGGAATTAACCCCCTGGAT 700

Query 1121 AACTATAACCTATTCTTAATTTCTAAGCTACACTATTTTTATATTTAAACGTCTTTTAGA 1180
          ||| |  ||| ||| |  ||||| |  | | |  | | ||  ||||| |  || ||||  ||
Sbjct 699 CACTGTGACCCATTGTCGATTTCCAGGTTGTATGAGCTTCGTATTTGAGCGCCTTTCCGA 640

Query 1181 GCTTATAATAACTATTCTAGATGTAATCTAGCCTATTATAAAGCTAGTCTTGTTAAAGTT 1240
          |||| |  | || ||||  | || ||  || || || |||||  ||||  |  ||||  ||
Sbjct 639 GCTTGTGACGACCATTCTGTGTTGAGATAACGCCCATCATAAAGCCGGTCTCATCGAAGTT 580

Query 1241 ATAGATATTAGACTTTATAATACTATATTTTTATAATTATATTCGCTACAAGGCGAAACCA 1300
          || ||||  |  ||| |  || ||  || |  ||||  ||||| ||||| |||||
Sbjct 579 GTAAATATCTGCGGCCGAATGCCGTACTTCGCAACCACATTCCGTACAAGGCGAAACCA 520

Query 1301 CACGTTTATTACGTCTAGATCTTCGCATTAAGCCCTCTTATAGTTATACTTACaaaaaaa 1360
          |  |||||  ||||  |||||  ||||  ||||| ||||| || || |  ||| ||
Sbjct 519 CGCGTTTATCGCGTCTGGATCTTCACATTGGGCCCTCTTATAGTCGTATCTGCGAAAGAA 460

Query 1361 aCGCGTTTAGAGCTCTAGTGTTCGTTTAAACAAAGTTCAAGGCCTAGCGCTTG---CCAAC 1417
          ||||| |  |||| |  || || || || ||||  |  ||||  |||  || ||
Sbjct 459 ACGCGTCTTTAGCTGTGGTTGTCGCTTGACGAAGTTTGAAGCCAG---TTGACTCCGAC 403

Query 1418 CAGAGGCGCGTTACAGTCAGTAAGCAGTTAATTAGCTATTTCTTTAACACTACTAAGGCA 1477
          |  |||||  |  ||| |  ||||  ||| || || ||||  ||  || ||| |
Sbjct 402 GTGTGGCGCGCCTCGGTGCGGAGCAGCCTATTGGCCATATCTTCCACGTCACGAAGCCG 343

Query 1478 GGGAGGAAATAATTAGGAATCTAGGTTAAGAATA 1511
          ||||| ||  ||||  ||||  |||||
Sbjct 342 GGGAGGAAATGATCGGAATCCAGGTCCAGAATA 309

```

- **2.3: DAHLIAE2 e TCg3\_64**

transposase [*Verticillium dahliae*]  
Length=542

Score = 494 bits (1273), Expect = 1e-168, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 269/529 (51%), Positives = 349/529 (66%), Gaps = 7/529 (1%)

```

Query 1 MVQYTKDEINRALQAVRNGYSLKRAAHEYGIPRTTLQYRMHGTQRRATAFEDLXRLSIAQ 60
          M +YT+DEIN+AL+A+ NG S+K A+ E+GIPRTTL R+ G Q R AF +LS Q
Sbjct 1 MPRYTEDEINQALEAIINGQSIKSASTEWEIGIPRTTLNRLQGQQPRDIAFSTQQKLSPTQ 60

Query 61 EASLAAWITTQADLGLPPTHQOVKELAQRIISAMGDTQPLGKRWVDGFKRRNPSIKVQRS 120
          E L WI QA LGLPPTH Q++E A+RIL G Q +GK W F RRNPSIKVQR+
Sbjct 61 EKHLVEWIRIQAAALGLPPTHSQIREFAERILHLQGGPQTIGKNWFQAFTRRNPSIKVQRA 120

Query 121 RSIDSRVNGASTEVIREXFKYLAMPYITAIKLANRYNMDETGILEGKGDNLVGLGRAET 180
          R IDS+R+NGA+T VIR+ F+YL++P I AI+ NRYNMDETGILEG+G NGLVLG AE
Sbjct 121 RPIDSQRINGATTNVIRDWFRYLSIPEIKAIQPVNRYNMDETGILEGRSNGLVLSAEA 180

Query 181 NLVRKKQPGSRAWVSIKICISAKGIPIYPLVIYKGGKVVXQWFPLDLSLYKGXEFIVIEN 240
          +RKKQPGSRAW SI++CISA G + PLVI+K GK V Q WFPLDL Y +F EN
Sbjct 181 QNLRKKQPGSRAWTSILECISATGTTVPPLVIFKGSVQQQWFPLDLQPYSSWKFTATEN 240

Query 241 RWTNATAVXKXIERVFLPXTKSPXPNXARLLILDHRHSYITTDFFIXLYYINNVLFLFLP 300
          WT N TAV ++ +F+P T+P+ P+ ARLLILD H S+ TT+F+ L Y NN++L+FL P
Sbjct 241 GWTDNDTAVFWLKEIFIPSTQPTNPSTARLLILDGHGSHETTEFMYLCYNNIHLVFLPP 300

Query 301 HTSYILXLLNXVVFSLIKAAYYKELRYLIXXNNLTIISKRFIICYXKAYXARITISNIK 360

```

```

Sbjct 301 HTS++L L+ VF +KAAY KEL YL N+ T++ KRNF+ CY KA + T NI+
HTSHVLQPLDQSVFGPLKAAAYRKELGYLEQWNDSTVVGKRNFLACYRKARQSAFTAQNIR 360

Query 361 SGXKYTRLWPITIIKPLISSYLLLDILALLTLPNKTLTLFNKGAKGAYSXGDAXDYEEEXV 420
SG K T LWP+++ P +S LLL+ T K+ G++ YE
Sbjct 361 SGWKSTGLWPVSMWPFLSP-LLLENSTNATRSVKSTLDRAIGSRAIQ-----QYETAT 413

Query 421 SAVKWSTLRKRRKLDNXLQLFSXIDXTIATXRXLFRKIKKGFXXQSFDLAIXHXIELLO 480
SAV WST RK L L F+ +D T R LFRK++KGF ++ + +A I++L+
Sbjct 414 SAVTWSTPRKTVDLQVQLAQFNQLDQPTNTQRLFRKVRKGFEEKDYLIATQQRRIQVLE 473

Query 481 AKVNNSTGRKRKKAVIDPNTKFATIKDIRQAQIKAGDAENEPDESSDLE 529
++ RK+K V I PN+KFA I+ I +AQI+AGD E+ E SDLE
Sbjct 474 QQLGEARPRKKKVRISPNSKFADIEAIHRAQIEAGDKEDNIGEISDLE 522

```

- **2.4: Collect2 e TCG1**

*Colletotrichum cereale* clone 9F8-1256 transposon Collect2, partial sequence  
Length=1255

Score = 998 bits (1106), Expect = 0.0  
Identities = 984/1266 (78%), Gaps = 27/1266 (2%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 601 TCCAGGACATCCATCCTTCCAACCTGATGGAATATGGATGAGACTGGTATTATGGAGGGGA 660
|| ||| || ||||| || ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 4 TCAAGGGTATTTCATCCATCTAACCGCTGGAATATGGATGAGACTGGCATTATGGAGGGCA 63

Query 661 AGGGAGCCAATGGGCTGGTGCTGGGCTCTGCGGCATCGCGATATATCCAGAAAAAGCAGC 720
| | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 64 AAGGGACCAATGGGCTGGTGCTGGGCTCTGCTGCATCGCGATATATCCAGAAAAACAGC 123

Query 721 CAGGATCCCGGCATGGATATCTATCATCGAGTGTGTGGCTGCTGATGGGAGGTCCCTAT 780
| ||||| ||| ||||| || | | | | | ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 124 CTGGATCTAGGGTATGGATCTCACTGTTGGAATGCGTGTCTGCTGATGGGCGATCCCTGC 183

Query 781 GCCCAGTAGTTATATATAAGGGCAAGTCTATCTAGACCTAATGGTTCCTATCTAACCTAT 840
||| | ||||| ||||| ||||| || || || | | ||||| ||| ||||| |||||
Sbjct 184 CCCCATTAGTTATATATAAGGGCAAGTCACTAGCCAGCCAGTAGTTCCTATCTAACCTAT 243

Query 841 CTAGATATGATGGTTGGCACTTTATA--TACTTTTATAATGGCTGGACGACTGACCGTAC 898
||||| ||| | ||||| | |||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 244 CTAGATACGATAGGTGGCACTTTGCAGCTACTG--ATAATGGTTGGACGACTGACCAGAC 301

Query 899 TGCCCTTGAATGGCTGGAGAAGGTCTTTATCCTAGGGACCATGCCAGAGGATTCAGATGC 958
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 302 TGCCCTTGAATGGCTGGAGAAGGTCTTTATCCTATATACCTAACCTACCAACCAGGGGC 361

Query 959 TGCCAGACTGCTGGTTCTAGATGCCCATCAGAGCCATATATCTGTTGACTTTATGTGGAA 1018
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 362 AGCCAGACTGTTGGTTCTAGATGGGCATCACAGCCATATAACCACTGACTTTATGTGGAA 421

Query 1019 ATGCTGGCAGCATCAGATCTATCTGTTATTTCTACCGCCGCACTCCTCTGCTGTCTCTCA 1078
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 422 ATGCTGGCAGCATCACATATGGCTGTTATATCTGCCGCCGCACTCCTCTGCAGTCTCTCA 481

Query 1079 GCCTCTAGATGTGGCTGTTTATGGCCTATTGAAGCAGTCTATTGCAAGGAGGTTGGATG 1138
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 482 GCCTCTAGATGTGGCTGTCTTTAGCCTATTGAAGAATGCCTATAGGCAGAAGGTTAGATC 541

Query 1139 TCTGGATGACTGGATCACGGATTCAACCATAGCTGGAAAAGGGGCATTTCTGGAGTGTTA 1198
| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

```



**ANEXO 3:** Sequência aberta de leitura (ORF) correspondente a proteína DNA metiltransferase identificada no genoma sequenciado de *C. graminicola* (*Colletotrichum graminicola* M1.001: Supercontig 5: 84970-87222 –); C-5 cytosine-specific DNA methylase [*Glomerella graminicola* M1.001] – Broad Institute, GenBank: EFQ26585.1

```

1  ATGGCAACCT TTCAACCTT GGGGGAGAGT CCTCAGTATG CCATTGACCT
51  TGATTTTGAC GAACCCGTCT TCTCATTAGG AGAACAGCGT GTCGTCGACA
101  TCGAGCGTCA GATTCATGCG TACCGCCCTA AGCCCAGAAA TAGCTCGCTC
151  CGCACTGATA TCAGCGGGCTT CGATGAGCAA ACGGAGGAAG AAATTGCCAG
201  CGAGGAGCTT GCCAACTTCA TCGACCTTAC TGTAGACGAT GATCCGGTCCG
251  TTACGGTTCG ATCCCAAAGG CGCCGCCGTG ACCCTACCCC GCGAGCTCCT
301  GAGCGCAAGC ATGAGAAAGT CAAGATTGCA GGAGGCCCTCT CGATTAAGCT
351  GAATACGCTC TACGAGCTGA GCCCTGAGCA TACACAAAAG TCAGCAATTG
401  AAAACCACTT CATTCTGGTT ACCGGAATAT ATGAGAATCT CTGGACACAC
451  GAGTATGCAG TCCGAGGCTT GCCGTTTACC AGGTCCCAGG CATTGATGGC
501  AAAACTTCCC CGAAAAGCTCA ACGAGGTTTT TGCACCTCTAT GAGATGGAGG
551  AGGGGGATGA CCGCACACCA GAGGATCAAG CATCTATCGA AGTCACAGTC
601  TCTGCGCTTC TCAGACCCCG GTCCCTACAC CTGACCAACG CGCCTTTCCC
651  TGAGCATCGT TTTGATCGAA AGATTTTTTG GCATCGCGCG GCAGTCGAAC
701  AAGAGGGCCC TCTGGTCTGC CGCTGGAAGT TTTACGTACA TTATCGCGAC
751  TCCAGCAAGA AGAGGGAGCG CAAGGCAAAC CACTGGTCTC TTGAGCGTAT
801  TAGAGCCAC GAGGTCATAC GGGACGAGTT CAGAGTTCCT GAGGAGGTTT
851  TCAAAGAGGA CTGGAGAGGC CAGACGATTC CAGGTGGCTC CAAAACGCCC
901  GAGACTGGAG GATTTGTTTC ATCCTCCAGC CTCACTGCAT CCAAACAGCA
951  ATACACCGTC TTCGACTCGT TCTGTGGTGC CGGTGGATT TCTCGCGGGG
1001  CAGAGCGCGC TGGGCTGCAT GTTAGATATG CCGTCGATAA CTGTGAGAAA
1051  GCTTGCGCAA CCTATCGCCT CAACTTTCCG AACACTAACC TCTTCGAAAC
1101  GTCTGTCGAT GAGCTTATGC GGTCCTCAAAA AGAAACTGAG TTGCGTACCG
1151  ATATCCTGCA TCTGTCACCT CCCTGTCAGA CATGGTCTCC AGCGCACACC
1201  GTTCCAGGTG CCAACGACGA GGCGAACATT GCCGCTTTAT TCGCCTGCCG
1251  AAGTCTTGTT GAGAAAGTAC GTCCTCGCAT CTTACCTTG GAACAGCCTT
1301  TCGGCATCAT GCAGCCCTGT TTCGATCCCT TCTTCTGCTC TCTCGTTGGA
1351  GGGTTCAC TGTTGGGTA CTCGGTCACC TGGAAGATTG TTCATCTTCA
1401  AAAGTGGGGC CTGCCCTAAA CCCGGAAAAG ACTAATCATG ATTGGAGCAT
1451  GCCCTGGTGA GAAGTTACCT CCTTCCCTT CGGCTACTCA TTCGGAGACT
1501  GGTGGAAGGG GCTTGTCGAA GTATGTTACG ATCCGCCAGG CACTGGCCAA
1551  GATCAATGTC ACGTCCACCT TTCACAACCC GGAAGAGGAG GTCAAGGACA
1601  CACTCCACT CGGGTCCGTC ATCAGCGACC CTGATCAGAT TCTCCGCAGA
1651  TGCGTGACCT GCTCAGGCGG GCAAAAATAT CACTGGTCTA ACACCAGATC
1701  ATACACGGTC CGCGAATTCG CCAGCCTCCA GGGGTTCCCC GTCTGGCACC
1751  AGTTTGCCGA TGCACCCAAG TCGGCCCTGA AGAAGCAGAT TGGAAACGCA
1801  TTCCAGCTT GCGTCGTGAG ACTTCTGTAC GAGCACCTCA AGAACTGGCT
1851  GCTCGTGGAG GACGGTCTTG CCCC GGCGCG AGAGCTGCGA GGCAGCGTTG
1901  GTGGCCGAGA GTTGGTCTTC GTATCGGAAG GTCCATGCCG TGAGACGCCT
1951  CCGTCCGCGC CCGTGCCGTG CCGTGGAGAA TTAGGAGGCT CTCATGAAGA
2001  CGCTATCATG CTGGACGATG ATGATGGAAT GCAGGTCGAT ATCAAGTATG
2051  ACGAGGTTTT TGATGTCGAT ATGACCGACG TGCCCGAAGC TCCTAACACT
2101  CCCGGTACTT TTGACGCACC GAATACGCCA AACACCCAG ACACGCCCTA
2151  CACACCTCGC TCGCGGTCAC GATCAAGAAC CTTATCATTC GGGGCTACAC
2201  CCAGCCCCAC GCCAGCTGTT GGCAGCAAAG ACTCGCCCAT TATGTTTGAC
2251  TAA

```

**ANEXO 4:** Sequência do transposon TCg1 amplificado a partir de DNA genômico de *Colletotrichum graminicola* - isolado brasileiro 2908m

```

1  ACTCCCCAC CCTATATCCG ACTCACCCCC ATATCCGAAC CATCCGAAAA
51  TGCCGCATCG CCCATCATCC ATCAACAACA TCACCTTTTT CAAACTATCA
101 CAACATTATC CATTCTACAC TAAACAACGC CTTTTTTTCA GGATATATTA
151 TTCATCGCAT CATAAAGCAG TATATCGAAA ATGAGGTCCA TCGGGCCCTT
201 CTAGATATTC TAGATGGGTA TAGTATCCGG GCTGCCGCTG ACAAGTGGGG
251 TATACCATAC CCAACACTTC GGCATCGATA CCACGGCAGG CAAAGCAGGA
301 GTACTGCCTT TATCCATAGG CAGCATTTAT TCTAGATCCA GGAGTATAAG
351 TTGGTTGCC ATATATGCCT TCAACAGTCC CTTGGCAGAC CCCTTAACTA
401 TTAACAAGTG AAGGGCCTGG CAGAGCGTAT GATGGGCGAT GGGCAGCAAC
451 GCATAGGGAG GAAGTGGATG CGCCGATTCC TGCGGCGAAA CCCATCAATT
501 GGAACCAGGC GATCCAGAGC AATAGATGCT TGGCGATGGG CAGCCCATCA
551 ACCTGAGGTT ATCCAGGATT TCTTCCATTG TCTGGGCAGT ATCGCTGCCA
601 TCCAGGACAT CCATCCTTCC AACTGATGGA ATATGGATGA GACTGGTATT
651 ATGGAGGGGA AGGGAGCCAA TGGGCTGGTG CTGGGCTCTG CGGCATCGCG
701 ATATATCCAG AAAAAGCAGC CAGGATCCCG GGCATGGATA TCTATCATCG
751 AGTGTGTGGC TGCTGATGGG AGGTCCCTAT GCCCAGTAGT TATATATAAG
801 GGCAAGTCTA TCTAGACCTA ATGGTTCCTA TCTAACCTAT CTAGATATGA
851 TGTTGGCAC TTTATATACT TTTATAATGG CTGGACGACT GACCGTACTG
901 CCCTTGAATG GCTGGAGAAG GTCTTTATCC TAGGGACCAT GCCAGAGGAT
951 TCAGATGCTG CCAGACTGCT GGTTCTAGAT GCCCATCAGA GCCATATATC
1001 TGTTGACTTT ATGTGGAAAT GCTGGCAGCA TCAGATCTAT CTGTTATTTT
1051 TACCGCCGCA CTCTCTGCT GTCCTCCAGC CTCTAGATGT GGCTGTTTAT
1101 GGCTATTGA AGCAGTCCTA TTGCAAGGAG GTTGGATGTC TGGATGACTG
1151 GATCACGGAT TCAACCATAG CTGGAAAAGG GGCATTTCTG GAGTGTATT
1201 TGAAGGCCCG CGGGGCATCT ATCACGATCC ATAACATCAA GGCTGGCTGG
1251 AAGGTAAGTG GGTATGGCC AGTATCAATG AGACGTCCCT TATCCAGCTC
1301 CTTGGTATCC AAGGCATCAT CCAGCCAGCC CAGCCAGCCC AGCCAGCCCA
1351 GCCAGCCCAG CCAGCAGCAG CCCAGCAGCC AACAGTGGGA TGAAGCCGTA
1401 TCTATCGTCC CATGGTCAAC CCCTCGCCGG TCTGCCGATC TACGGCATCA
1451 GTTACACCAG ATGGGCCAGC TGGTCAAGGA TGGGATAGAT ATCCATACTT
1501 ATCGTCACCT ATCTAGAAAG GTGCAAAAGG GGTATGATGA GGAGGCATAT
1551 GAGAAGGCAC TTCTAGCAAG GCAGAACGAC GCATTACGGG CTCAGTTAGA
1601 AGACCTTCAG TCACGCAAGA GGAAAAAGGT CCCCCTATCG CCCAACAGCG
1651 CCTTCGTTAA TATAGGGGAT GTCCAGCGGG CAGAAAATCC GGATGCCGGC
1701 CGAATAGATA GTCCGGATGA ATCCAGCGCA TCCGAATTAT CCAGCGAGGC
1751 CGAAAGTTGC ATATGGGTGG GCGGCAAGCC CGAGGAAATA AGTGGTGATA
1801 GTGGTGGTGA TGATGGTGAT GATGTGGTTC ACATATAGGG CTGGTTCGGA
1851 TATAGGGTGG GGGAGT

```

\* As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (baseados nas extremidades de TCg1.1\_8) utilizados para essa amplificação estão realçadas em cinza