

MATEUS FERREIRA SANTANA

RETROTRANSPOSONS LTR NO GENOMA DE *Moniliophthora perniciosa* E  
*Cochliobolus heterostrophus*

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2009

MATEUS FERREIRA SANTANA

Retrotransposons LTR no genoma de *Moniliophthora perniciosa* e *Cochliobolus heterostrophus*

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

APROVADA: 24 de Julho de 2009

---

Prof<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Prof<sup>o</sup> Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes

---

Prof<sup>o</sup> Mauricio Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz  
(Orientadora)

Aos meus pais, Fernando e Maria das Dores,  
À minha irmã, Lívia,  
Com amor,  
Dedico!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder tantas oportunidades.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade oferecida e pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Marisa Vieira de Queiroz, pela paciência, pela dedicação, pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Elza Fernandes de Araújo, pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica e pelos ensinamentos nas disciplinas.

Ao meu co-orientador Eduardo S. G. Mizubuti pelos ensinamentos em biologia de populações de fitopatógeno, pelos conselhos e pela dedicação para este trabalho.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela contribuição valiosa para este trabalho.

Ao professor Mauricio Dutra Costa, pela contribuição para este trabalho, pela orientação segura no Estágio em Ensino e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus amigos do Bioagro, Ireninha, Swiany, Liandro (Leandro), Leandro L., Phelpes (Maycon), Rafarilo (Rafael), Jaque (Jaqueline), Gara (Rafael), Mari (Mariana), a outra Mari (Mariane), as Ana's (Ana Paula, Ana Andréia e Ana Angélica), Jana (Janaina), Andréa, Rodrigo, Carolina, Daniel, Emilene, Fábio, Francisco, Leonardo, Guilherme, Juline, Alessandra, Marcelo, Ana Paula, Nívea, pelo excelente convívio e pela descontração no cafezinho.

Aos meus grandes amigos, Getúlio e Danilo, pela amizade sincera e pelo apoio.

À todos os meus familiares, meu alicerce para continuar esta caminhada., em especial aos meus pais, Fernando e Maria da Dores, e a minha irmã, Livia pelo grande apoio e pelo incentivo na minha carreira. Sem vocês meu sacrifício não teria sentido.

À minha namorada, Mariana, pela paciência, pelo apoio e pelo carinho em todos os momentos.

## **BIOGRAFIA**

Mateus Ferreira Santana, filho de Fernando Santana e Maria das Dores Ferreira Santana, nasceu no dia 09 de agosto de 1983 na cidade de Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em março de 2003, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se bacharel, com ênfase em microbiologia, em agosto de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de mestrado, no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em julho de 2009.

Em Junho de 2009, foi aprovado para cursar o Doutorado no mesmo programa.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Cochliobolus heterostrophus</i> .....	2
2.2 <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	3
2.3 Elementos transponíveis.....	5
2.4 Classificação.....	5
2.5 Regulação da atividade de transposição.....	7
2.5.1 RIP (Repeat-Induced Point Mutation).....	9
2.6 Elementos transponíveis e a evolução do genoma.....	10
2.7 Retrotransposon como marcador molecular.....	12
2.7.1 S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism).....	13
2.7.2 IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) e REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).....	14
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
<b>CAPÍTULO I – USO DO RETROTRANSPONON <i>MpSaci</i> DE <i>Moniliophthora perniciosa</i>, AGENTE CAUSAL DA VASSOURA DE BRUXA NO CACAUEIRO (<i>Theobroma cacao</i>) como marcador molecular.....</b>	<b>26</b>
1- RESUMO.....	27
2- INTRODUÇÃO.....	28
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Obtenções de populações de <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	31
3.2 Extração de DNA total.....	34
3.3 IRAP e REMAP.....	34
3.6 Análises dos amplicons gerados.....	35
4- RESULTADOS.....	37
5- DISCUSSÃO.....	42
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
<b>CAPÍTULO II - <i>SOPHIE</i>, RETROTRANSPONON DO GRUPO <i>Gypsy/Ty3</i> NO FITOPATÓGENO <i>Cochliobolus heterostrophus</i>, AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR EM MILHO.....</b>	<b>48</b>
1- RESUMO.....	49
2- INTRODUÇÃO.....	50
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Identificação, classificação e análise filogenética da proteína transcriptase reversa de <i>Sophie</i> .....	52
3.2 Análise dos ácidos nucleicos e proteínas.....	52

3.3 Evidências de RIP.....	53
4- RESULTADOS.....	53
4.1 <i>Sophie</i> , um retrotransposon do grupo <i>Gypsy/Ty3</i> .....	53
4.2 RIP (Repeat-Induced Point Mutation) em seqüências de transcriptase reversa de <i>Sophie</i> presentes em <i>Cochliobolus heterostrophus</i> .....	62
5. DISCUSSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CONCLUSÃO.....	72

## RESUMO

SANTANA, Mateus Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009.  
**Retrotransposon LTR no genoma de *Moniliophthora perniciosa* e *Cochliobolus heterostrophus*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araujo e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Retrotransposons do grupo *Gypsy/Ty3* são os principais elementos transponíveis encontrados no genoma de fungos fitopatogênicos. Neste trabalho, dois retrotransposons denominados de *MpSaci* e *Sophie* foram analisados em *Moniliophthora perniciosa* e *Cochliobolus heterostrophus*, respectivamente. *MpSaci* foi utilizado para avaliar os marcadores moleculares baseados em elementos transponíveis IRAP e REMAP. Quando 70 isolados de *M. perniciosa* foram analisados, o total de 43 locos foram amplificados gerando 46,51% de bandas polimórficas. Diferenças significativas foram encontradas entre as populações de *M. perniciosas* divididas em relação ao biótipo e à origem geográfica, demonstrando que as populações encontram-se estruturadas quanto à origem geográfica e ao hospedeiro (biótipo). Pela análise de agrupamento de diferentes regiões geográficas do biótipo C foram observados dois grandes grupos que evidenciam duas principais entradas do patógeno no estado da Bahia. Buscas feitas no banco de dados do Projeto Genoma de *C. heterostrophus* (*JGI - Genome*) revelaram a presença de seqüências de DNA com similaridade a transcriptase reversa de elementos da Classe I pertencentes ao grupo *Gypsy/Ty3*. Com base nessas seqüências foi possível encontrar sete cópias diferentes e intactas de um elemento transponível que foi denominado *Sophie*. A análise de 37 seqüências do gene da transcriptase reversa demonstrou possível mecanismo de silenciamento semelhante a RIP. As sete cópias do elemento *Sophie* apresentaram 7.426 pb a 7.512 pb. O retrotransposon *Sophie* possui duas seqüências de leitura abertas (ORFs) que codificam a proteína *Gag* e a poliproteína *Pol*. A presença de diferentes sítios-alvo sugere que *Sophie* é um elemento com atividade recente no genoma de *C. heterostrophus* podendo ter grande impacto na evolução do genoma do seu hospedeiro.

## ABSTRACT

SANTANA, Mateus Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009.  
**LTR retrotransposon in the genome of *Moniliophthora perniciosa* and *Cochliobolus heterostrophus*.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisors: Elza Fernandes de Araujo and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

*Gypsy/Ty3* group retrotransposons are the main transposable elements found in the genome of pathogenic fungi. In this work, two retrotransposons termed *MpSaci* and *Sophie* were analyzed in *Moniliophthora perniciosa* and *Cochliobolus heterostrophus*, respectively. *MpSaci* was used to assess molecular markers based on transposable elements IRAP and REMAP. When 70 isolates of *M. perniciosa* were analyzed, a total of 43 loci were amplified by generating 46.51% polymorphism. Significant differences were found between populations of *M. perniciosa* divided in relation to biotope and the geographical origin, showing that populations are structured on the geographical origin and the host (biotype). The cluster analysis of different geographical regions of biotype C were observed two large groups that show two main entrances of the pathogen in the state of Bahia. Searches done in the database of the Genome Project of *C. heterostrophus* (JGI- Genome) showed the presence of DNA sequences with similarity to reverse transcriptase of Class I elements belonging to the group *Gypsy/Ty3*. Based on these sequences could be found seven different copies of an intact transposable element named *Sophie*. The analysis of 37 sequences of the reverse transcriptase gene showed a possible silencing mechanism similar to RIP. The seven copies of the element *Sophie* had 7426 bp 7512 bp. The retrotransposon sequences *Sophie* has two open reading frames (ORFs) that encode the *Gag* protein and the *Pol* polyprotein. The presence of different target sites suggests that *Sophie* is an element with recent activity in the genome of *C. heterostrophus* can have a great impact on the evolution of the genome of its host.

# 1- INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis são seqüências de DNA repetidas, dispersas no genoma do hospedeiro, com capacidade de migrar. Prevalentes em muitos genomas eucariotos, estes elementos exercem diversos efeitos, influenciam a organização, a integridade e a evolução do genoma hospedeiro e regulam a expressão de genes em diferentes espécies. Embora tenham sido descobertos há mais de 60 anos, somente com o advento do seqüenciamento completo dos genomas e a constatação de que os transposons ocupam fração importante do genoma do hospedeiro é que esses elementos receberam maior atenção e deixaram de ser vistos como “DNA lixo”. Esses elementos estão presentes em cerca de 15% do genoma de *Drosophila melanogaster*, 45 % do genoma humano e até 65 % do genoma do milho.

A movimentação de transposons no genoma hospedeiro é capaz de gerar rearranjos, novos alelos e modificar a expressão gênica. Dessa forma, são considerados agentes centrais na reestruturação evolutiva dos genomas de seus hospedeiros. A atividade de transposição pode ser aumentada de acordo com estresses abióticos e bióticos. Além disso, diferentes estratégias de silenciamento são responsáveis pelo controle desses elementos. Entre essas estratégias estão a metilação, iRNA e RIP (mutação de ponto induzida por repetição).

O isolamento e caracterização de elementos transponíveis em fitopatógenos possibilitam maior conhecimento sobre a organização e a evolução do genoma desses fungos e de mecanismos de silenciamento gênico. Além disso, permite a aplicação desses elementos em sistemas de inativação gênica e como marcadores moleculares para traçar o perfil populacional de fungos fitopatogênicos. Os elementos transponíveis podem ser utilizados para inativação gênica e em estudos de população. A utilização dos transposons como marcadores moleculares representa nova ferramenta para o entendimento da estrutura populacional e epidemiologia de fungos fitopatogênicos.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi estudar dois retrotransposons do grupo *Gypsy/Ty3*, presentes, respectivamente, nos genomas de dois fungos fitopatogênicos, *Moniliophthora perniciosa* e *Cochliobolus heterostrophus*.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Cochliobolus heterostrophus*

O gênero *Cochliobolus* tem sido extensivamente estudado devido a sua patogenicidade a várias plantas de importância agrícola. *Cochliobolus heterostrophus* (forma anamórfica = *Bipolaris maydis*) é patógeno de milho e pode ser encontrado em muitas áreas tropicais e subtropicais (Weikert-Oliveira *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos, esse fungo é geralmente encontrado nos estados do sul, por isso a doença foi denominada de “Southern Corn Leaf Blight” (SCLB) ou mancha foliar (Drechsler, 1934).

Considerado como fungo necrotrófico modelo devido a sua fácil manipulação, *C. heterostrophus* tem sido utilizado em estudos de produção de toxina na interação planta patógeno (Bronson *et al.*, 1990), para análise molecular de genes de “mating-type” (Turgeon *et al.*, 1993), rDNA (Taga *et al.*, 2003), pigmentação (Tanaka *et al.*, 1994) e resistência a fungicida (Gafur *et al.*, 1998a).

A espécie *C. heterostrophus* é capaz de produzir toxinas que servem como fatores de virulência ou patogenicidade. Com base na produção de uma toxina denominada de T, duas raças do patógeno podem ser consideradas: a raça T que produz a toxina T e a raça O que não produz. O patógeno já causou sérias perdas de produção e somente em 1970, estima-se que um bilhão de dólares foi perdido nos EUA, pela epidemia causada pela raça T. Uma terceira raça, a raça C, tem sido reportada na China, mas se desconhece sua ocorrência em outras regiões (Tzeng *et al.*, 1992, Yang *et al.*, 1996).

*Cochliobolus heterostrophus* é fungo ascomiceto, heterotático, haplóide, com fase sexual raramente encontrada na natureza, mas facilmente induzida em laboratório (Raju, 2008). O fungo infecta a planta hospedeira, formando apressórios que parecem não ser essenciais à penetração, que pode ocorrer via estômato ou diretamente pela epiderme. Os sintomas e a severidade da doença dependem da raça do patógeno e do germoplasma do hospedeiro. As lesões causadas pela raça O geralmente são menores e acometem principalmente as folhas; já a raça T causa lesões nas folhas e em qualquer parte da planta com exceção das raízes. Sementes infectadas com a raça T não sobrevivem mais do que quatro semanas. Os danos

gerados são decorrentes da dificuldade da planta infectada realizar fotossíntese. A raça T pode ainda levar à putrefação de várias partes da planta (Wallin & Loonan, 1977; Byrnes *et al.*, 1989). A melhor medida para controle da doença é o emprego de cultivares resistentes de milho (Wallin & Loonan, 1977).

Kodama *et al.* (1999) detectaram dois locos (Tox1A e Tox1B) do gene da toxina T que podem ter sido originados devido à translocação envolvendo elementos transponíveis. Esse rearranjo propiciou benefícios a *C. heterostrophus* influenciando a evolução da relação entre a planta e o fungo. Em *Cochliobolus carbonum*, a raça 1 é patogênica em alguns genótipos de milho devido a produção da toxina HC. A produção dessa toxina é controlada, pelo menos em parte, por uma região duplicada de DNA de 22 Kb, flanqueada por transposons da família *Fot 1* (Panaccione *et al.*, 1996). Portanto, é possível que os elementos transponíveis possam ter um papel importante na estruturação do genoma de *C. heterostrophus*, permitindo um aumento na adaptação deste fitopatógeno ao ambiente e dificultando o controle da doença.

## **2.2 *Moniliophthora perniciosa***

A vassoura-de-bruxa é uma das doenças mais importantes e destrutivas do cacauero e pode causar perdas de até 90% da produção. A doença foi relatada pela primeira vez no Suriname, em 1895, e embora ocorresse de forma endêmica na região Amazônica, desde o século XIX, só foi constatada no sul da Bahia, principal região produtora de cacau do Brasil, em 1989 (Pereira *et al.*, 1989). A doença é causada por *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Singer, fungo pertencente à classe dos basidiomicetos, ordem Agaricales e família Tricholomataceae (Silva, 1987).

A variabilidade dentro da espécie tem sido detectada quando isolados de origens diferentes são comparados. Tal variabilidade tem sido traduzida, por exemplo, em termos de crescimento micelial em meios de cultura, tipos de reação em alguns testes bioquímicos, compatibilidade somática e patogenicidade ao cacauero e a outros hospedeiros (Oliveira & Luz, 2005). A larga gama de hospedeiro tem incitado vários autores a propor um sistema de classificação baseado em especificidade de

hospedeiro: o biótipo C infecta espécies de *Theobroma* e *Herrania* (Malvaceae); o biótipo S afeta vários membros de *Solanaceae*; o biótipo L é encontrado em videiras e é heterotático; o biótipo B infecta *Bixa orellana*. O biótipo C e S causam os sintomas típicos de vassoura-de-bruxa em seus hospedeiros (Bastos & Anderbrah, 1986; Griffith & Hedger, 1994a).

*Moniliophthora perniciosa* é considerado hemibiotrófico e possui ciclo de vida dividido em duas fases, uma parasítica e outra saprofítica (Suárez & Delgado, 1993). O inóculo primário é o basidiósporo, unidade infectiva do patógeno (Purdy & Schmidt, 1996). A liberação dos basidiósporos ocorre preferencialmente à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pela corrente dos ventos. Os mesmos têm vida curta, sensibilidade à luz, e em condições naturais não sobrevivem mais do que uma hora (Oliveira & Luz, 2005).

A sintomatologia da doença é bastante variada. Quando o fungo infecta ramos ou brotos vegetativos provoca inchaço da parte afetada, acompanhada da proliferação de pequenos brotamentos próximos uns dos outros, onde se prendem as folhas grandes curvadas e retorcidas, que parecem vassouras-de-bruxa, daí advindo o nome da doença. Os principais métodos de controle da doença compreendem a poda fitossanitária, o controle biológico e químico e o melhoramento genético visando à resistência (Oliveira & Luz, 2005).

Análises empregando os marcadores RFLP de DNA mitocondrial, ITS e IGS da região do rDNA revelaram alto grau de variabilidade genética (Griffith & Hedger, 1994b). Outras ferramentas têm sido utilizadas como RAPD (Andebrhan *et al.*, 1999), ERIC-PCR (De Arruda *et al.*, 2003) e cariotipagem molecular (Rincones *et al.*, 2006), entretanto, os resultados não foram correlacionados. Em geral, a variabilidade entre isolados do biótipo C é maior na Amazônia que na Bahia. Provavelmente o material introduzido na Bahia tenha se originado de isolados da Amazônia (De Arruda *et al.*, 2003).

Um dos processos conhecidos que podem gerar alta variabilidade em fungos fitopatogênicos é a atividade de elementos transponíveis. Estes podem ser os principais responsáveis pela alta adaptabilidade e plasticidade apresentada por muitas espécies de fungos. A análise de transposon de espécies fitopatogênicas pode contribuir para estudos evolutivos e de transferência genética. Esses

elementos podem ser utilizados como marcadores para traçar o perfil de populações (Murata *et al.*, 2008) e para rastreamento e identificação de raças específicas de patógenos (Pasquali *et al.*, 2007). Elementos transponíveis também podem ser usados em sistemas de inativação de genes *in vitro* e *in vivo* (Kempken & Kück, 2000; Nicosia *et al.*, 2001; Vilalba *et al.*, 2001).

## 2.3 Elementos transponíveis

Elementos transponíveis são seqüências genômicas repetidas que são capazes de migrar dentro do genoma hospedeiro e afetar o genoma por sua capacidade de mover e replicar, assim gerando plasticidade. Esses elementos mostram extrema diversidade e podem constituir grande parte do genoma de muitos organismos. Em fungos, elementos transponíveis podem representar de 3 a 21 % do genoma (Bowen & Jordan, 2002; Huan – Van *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008).

## 2.4 Classificação

Os elementos transponíveis podem ser classificados em ordem hierárquica em: classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Existem duas classes de elementos que se diferenciam na presença ou ausência de um RNA intermediário no processo de transposição. Na classe I, a partir de uma cópia de RNA do transposon ocorre, via transcriptase reversa, a síntese de DNA que então é capaz de se inserir em um sítio alvo. Nos elementos da classe II, ocorre diretamente um processo de excisão seguido de integração. A classe II é dividida em duas subclasses. A subclasse 1 é composta por elementos que não se duplicam antes da inserção e se transpõem por mecanismos de excisão e integração com ambas as fitas do DNA clivadas durante o processo de excisão. Na subclasse 2 ocorre a duplicação do elemento antes da inserção com a clivagem de apenas uma das fitas de DNA. A classificação em ordem é baseada nas diferenças de organização do elemento transponível e também em sua enzimologia. As superfamílias que pertencerem à mesma ordem compartilham uma estratégia de replicação em comum, mas podem se diferenciar quanto à estrutura das proteínas, regiões não

codificantes e presença e tamanho da duplicação do sítio alvo. As famílias de elementos transponíveis são definidas de acordo com a identidade na seqüência de DNA dos elementos transponíveis que a compõem. As famílias podem ainda serem divididas em subfamílias definidas com base em dados filogenéticos (Wicker *et al.*, 2007).

Todos os elementos transponíveis da Classe I transpõem via um RNA intermediário, que é transcrito de uma cópia do genoma e um cDNA é sintetizado via uma transcrição reversa codificada pelo próprio elemento. Cada ciclo completo de transposição produz uma nova cópia. Conseqüentemente, retrotransposons são freqüentemente os principais colaboradores para uma fração repetitiva do genoma. Os retrotransposons podem ser divididos em cinco ordens com base no mecanismo de transposição, organização e filogenia da transcriptase reversa: retrotransposon LTR, DIRS-like, Penélope-like, LINEs e SINEs (Wicker *et al.*, 2007).

Os retrotransposons LTR (*Long Terminal Repeat*) são predominantes em eucariotos e apresentam seqüências repetidas diretas (LTRs) que flanqueiam uma região codificadora. Esses retrotransposons possuem tamanhos variáveis, podendo chegar a 25 kb. Eles tipicamente contêm ORFs denominadas *gag* e *pol*. A região *gag* codifica proteínas estruturais que formam uma partícula semelhante a vírus (proteínas do capsídeo). Ocasionalmente existe uma ORF de função desconhecida. Já a região *pol* codifica uma protease, uma transcriptase reversa, uma RNAse e uma integrase (Havecker *et al.*, 2004). Uma terceira ORF denominada *env* pode ainda ser encontrada em *Drosophila melanogaster*, mas nenhuma evidência clara tem sido relatada desta região em outros organismos. Este gene está relacionado com a síntese de envelope em retrovírus (Hua-Van *et al.*, 2005).

As duas principais superfamílias de retrotransposons são *Gypsy* e *Copia* que diferem na ordem das regiões que codificam a transcriptase reversa e a integrase na região *pol* (Neumann *et al.*, 2003). O grupo *Gypsy/Ty3* é o principal grupo de elementos transponíveis encontrado em fungos fitopatogênicos (Daboussi & Capy, 2003).

Elementos transponíveis de fungos podem ser identificados por uma variedade de estratégias. Elementos ativos e inativos podem ser detectados em seqüências repetidas dispersas no genoma do organismo. Devido ao grande número de genomas que estão sendo seqüenciados, a busca e análise de elementos

transponíveis se tornou mais fácil e eficiente. Com o advento do seqüenciamento do genoma de fungos fitopatogênicos, como o Projeto Genoma de *M. perniciosus* ([www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura)) e *Cochliobolus heterostrophus* ([http://genomeportal.jgi-psf.org/CocheC5\\_1/CocheC5\\_1.home.html](http://genomeportal.jgi-psf.org/CocheC5_1/CocheC5_1.home.html)), novas estratégias, como análise “in silico”, estão sendo utilizadas em conjunto com as ferramentas de biologia molecular. O seqüenciamento do genoma de eucariotos é de grande significância para a análise da diversidade de elementos moveis, sua estrutura, evolução, e possíveis efeitos no hospedeiro (Pereira, 2005). Elementos ativos podem ser “capturados” empregando genes alvos, uma vez que parte das mutações espontâneas é gerada pela inserção de tais elementos. Os genes utilizados como alvos devem ter a seqüência conhecida e os mutantes devem apresentar um fenótipo facilmente evidenciado (Kinsey & Helber, 1989). Outras estratégias utilizadas são a amplificação via reação de polimerização em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos para regiões conservadas do retrotransposon ou hibridização com transposons isolados de outros organismos (Farman *et al.*, 1996).

Devido ao grande número de elementos transponíveis presentes no genoma de eucariotos, espera-se que a movimentação desses seja esporádica. Dessa forma, devem existir diferentes mecanismos de regulação (Kazazian, 2004).

## **2.5 Regulação da atividade de transposição**

Transposição em resposta ao estresse ambiental tem sido proposta como uma forma de resposta adaptativa do genoma (Bouvet *et al.*, 2008). Necessariamente, vários transposons em plantas e fungos são ativados sob condições de estresse, tais como temperatura, irradiação e estresse oxidativo (Ikeda *et al.*, 2001). Alguns desses fatores têm sido testados em fungos. Os resultados demonstram que vários fatores bióticos e abióticos levam ao aumento da atividade de transposição (Daboussi & Capy, 2003).

Outro fator importante relacionado à indução da atividade de transposição é o ciclo sexual (Eto *et al.*, 2001). Existem relatos em *Drosophila* e *Pyricularia grisea* que o cruzamento de indivíduos ou isolados diferentes levam a um aumento da atividade de alguns elementos transponíveis (Labrador *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2001).

Os elementos transponíveis são fortemente influenciados pelo modo de reprodução, sendo que em organismos assexuados a propagação do transposon é muito inferior a dos organismos de reprodução sexuada (Zeyl *et al.*, 1996). Nestes últimos, existe a propagação dos transposons em todos os indivíduos da população. A alta atividade de elementos transponíveis é correlacionada ao mecanismo de reprodução sexuada, pois essa atividade leva a um número grande de mutações deletérias e isso seria inconsistente com uma população assexual (clonal) (Bowen & Jordan, 2002). Entretanto, essa atividade é perfeitamente aceitável em populações que se reproduzem de forma sexual e dessa forma possuem uma gama muito grande de variabilidade genética para diferentes pressões de seleção. A reprodução sexual é muito eficiente para ajudar a eliminar as mutações deletérias que os elementos freqüentemente causam (Wright & Finnegan, 2001, e Arkhipova & Meselson, 2004).

A atividade de transposon na interação planta-patógeno é de extrema importância em relação à suplantação de resistência ou ganho de virulência. A freqüência de aparecimento de novas raças ou patótipos de fungos tem sido correlacionada com atividade de transposição como ocorrido em *M. grisea*, na qual a atividade do transposon *Pot3* modificou o espectro de virulência do fungo (Kang *et al.*, 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, os transposons são importantes para o conhecimento da organização da especificidade entre hospedeiro e patógeno e da rapidez com que o patossistema muda. Para esse fim, a conservação e a dispersão de elementos transponíveis nos fungos tem demonstrado ser uma valorosa marca no estudo de populações de patógenos de plantas e animais. Sinais filogenéticos baseados em sondas para regiões conservados dos transposons podem ser utilizados para fazer inferências sobre especiação e evolução natural do genoma. Então, as diferentes localizações dos transposons nos genomas dos indivíduos podem causar ou pelo menos serem correlacionados com diferenças fenotípicas (Gabriel *et al.*, 2006).

Devido à proporção substancial de elementos transponíveis nos organismos estudados, eles são considerados hoje como fatores na evolução de genomas (Kazazian, 2004). As células hospedeiras possuem estratégias como metilação de DNA e RNA de interferência (RNAi) para controlar de forma negativa a atividade de

elementos transponíveis. Outra forma pela qual o genoma controla de forma negativa a expressão de elementos transponíveis é o mecanismo denominado de RIP (mutação de ponto induzida por repetição) (Selker *et al.*, 1987).

### **2.5.1 RIP (mutação de ponto induzida por repetição)**

Os elementos transponíveis são capazes de provocar alterações de expressão gênica quando uma nova cópia se insere dentro de um gene ou na região regulatória. Devido ao seu alto número de cópias, os transposons também podem provocar eventos de recombinação no genoma. Dessa forma, a atividade de um elemento pode ser prejudicial ao organismo que o abriga. Entretanto, o genoma do hospedeiro possui “armas rápidas” para combater esses eventos (Lovsin *et al.*, 2001).

Uma das defesas do genoma contra elementos transponíveis é o mecanismo RIP (mutação de ponto induzida por repetição) que foi detectado principalmente em fungos ascomicetos. RIP é um mecanismo de silenciamento de gene que leva à mutação de seqüências de DNA repetidas durante o ciclo sexual, entre a fertilização e a fusão nuclear. A ocorrência de RIP previne acúmulo de elementos transponíveis em fungos. Esse mecanismo também pode estar relacionado à divergência gradual de genes duplicados em *Neurospora crassa* que é considerado como essencial para o surgimento de genes com novas funções (Selker *et al.*, 2003; Galagan & Selker, 2004).

Os detalhes do mecanismo e a interação específica entre proteína/DNA ainda não são bem conhecidas, mas as propriedades gerais de RIP tem sido bem caracterizadas em várias espécies de fungos como em *N. crassa* (Selker *et al.*, 2003; Galagan & Selker, 2004), *Microbotryum violaceum* (Hood *et al.*, 2005), *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* (Braumann *et al.*, 2008) e *Colletotrichum cereale* (Crouch *et al.*, 2008).

Em geral, RIP induz mutações GC para AT em seqüências duplicadas de DNA que possuam mais de 400 pares de bases e com identidade maior que 80% (Novikova *et al.*, 2007). Resíduos de citosina com certas combinações de nucleotídeos são metilados, como ocorre em *N. crassa*, onde dinucleotídeos CA são alvos de RIP. Metilação de citosina é, freqüentemente, associada a mutações do tipo

RIP e em *N. crassa* a metil transferase (RID) é responsável por essa metilação (Freitag *et al.*, 2002). Dados experimentais *in vivo* indicam que nesse fungo as seqüências mutadas por RIP são tipicamente metiladas (Selker *et al.*, 2003). Entretanto, observações experimentais de RIP requerem que a espécie do fungo possa ser cultivada em condições de laboratório e que a linhagem possa ser transformada. No entanto, processos semelhantes a RIP podem ser também detectados por análises *in silico* de elementos repetidos no genoma via *softwares* que permitam o alinhamento de regiões repetidas e análise de mudança na freqüência de dinucleotídeos relacionadas com RIP (Hane & Oliver, 2008).

Dois índices  $TpA/ ApT$  e  $(CpA + TpG)/ (ApC + GpT)$  são comumente utilizados para detecção de RIP “*in silico*”. O índice  $TpA/ ApT$  é um índice simples e mensura a freqüência de produtos de RIP,  $TpA$ , com correlação para falso positivo devido a regiões ricas em A:T. Altos valores de  $TpA/ ApT$  indicam forte resposta a RIP. O índice  $(CpA + TpG)/ (ApC + GpT)$  é em principio similar a  $TpA/ ApT$ , mas mensura a depleção de alvos de RIP,  $CpA$  e  $TpG$ . Nesse caso, baixos valores de  $(CpA + TpG)/ ApC + GpT$  são forte indicativo de RIP. Índices adicionais para RIP podem ser definido na forma  $(CpN+NpG)/(TpN+NpA)$ , que representa a taxa de conversão de dinucleotídeos pré-RIP a dinucleotídeos pós-RIP, para a característica de mutação de dinucleotídeos  $CpN$  para  $TpN$  e seu reverso complementar  $NpG$  a  $NpA$  (Hane & Oliver, 2008).

Além de silenciar os genes de elementos transponíveis, RIP também é capaz de evitar que ocorram eventos de recombinação devido à diminuição da identidade entre as seqüências (Cambareri *et al.*, 1991).

## **2.6 Elementos transponíveis e a evolução do genoma**

Elementos móveis têm dirigido a evolução de genomas em diversos caminhos. Particularmente em plantas e mamíferos, retrotransposons constituem grande fração do genoma e tem moldado os genes e o genoma como um todo. Embora o hospedeiro possa controlar seu número, a expansão de retrotransposons tem sido tolerada durante a evolução. Atualmente, os elementos transponíveis são ferramentas utilizadas para se entender mais sobre a evolução do genoma (Kazazian, 2004).

A dinâmica do elemento transponível pode ser dividida em várias fases. A primeira é necessariamente a invasão da população com a chegada de um novo elemento ativo no genoma da espécie ou a reativação de uma cópia inativa de transposon, ou ainda, transferência horizontal. Em qualquer situação, o elemento foi imediatamente ativo e com taxas de transposição eficientes, caso contrário seu número diminuiria devido à provável deriva genética e seleção natural (Rouzic & Capy, 2005).

O próximo passo não tem sido observado diretamente, mas muito dos elementos transponíveis se tornam inativos. Além disso, a proporção de cópias ativas é altamente heterogênea entre espécies. Duas hipóteses podem ser propostas para explicar essa heterogeneidade. A primeira seria que alguns elementos da mesma família não estariam na mesma fase de evolução em seus hospedeiros. A segunda é que a evolução do elemento transponível poderia sofrer diferentes interferências seja devido a uma característica intrínseca do elemento ou do hospedeiro ou da interação transposon-hospedeiro. Ambas as hipóteses não são exclusivas e a inativação do elemento transponível pode ser explicada por ambos os processos (Rouzic *et al.*, 2007).

O efeito da inserção do elemento transponível dependerá do loco onde ocorrer (exon, intron, promotor, etc). De qualquer forma, as alterações causadas por um evento de transposição são, geralmente, baixas, porque mutações deletérias são preferencialmente eliminadas. Dessa forma, uma parte dos efeitos deletérios do elemento transponível pode ser devido a efeitos de recombinação entre elementos da mesma família. Entretanto, um efeito putativo da presença de elementos transponíveis pode ser sugerido, porque a atividade mutacional de elementos transponíveis, excluindo as inserções deletérias, pode promover diversidade genética e aumentar a velocidade do processo de adaptação, além do fato de alguns transposons serem ligados a genes e controlarem sua expressão. Esse é um processo denominado de domesticação e representa um exemplo de expansão a nível molecular de elementos transponíveis (Bowen & Jordan, 2002; Hua-Van *et al.*, 2005; Rouzic *et al.*, 2007).

Uma última condição de dinâmica de elementos transponíveis no genoma seria o estado de equilíbrio em que seria mantido um número constante de cópias do elemento no genoma. Este estado só seria possível se houvesse baixa taxa de

mutação, baixa taxa de inserções adaptativas e baixa amplitude de mutações. Entretanto, essas condições contrastam com o que geralmente ocorre em elementos transponíveis, que são instáveis no genoma e freqüentemente sujeitos a recombinação, deleções e inativações (Rouzic *et al.*, 2007).

## 2.7 Retrotransposon como marcador molecular

Os elementos transponíveis variam de espécie para espécie em relação ao seu conteúdo e atividade. Os retrotransposons são importantes tanto como ferramenta molecular quanto para a biologia evolutiva. Devido a sua abundância, modo de amplificação e inserção no genoma, os retrotransposons possuem características que podem ser usadas para discriminação de espécies ou genótipos (Flores *et al.*, 2004; Hansen & Heslop-Harrison, 2004).

Cada evento de transposição gera um polimorfismo de inserção que pode ser identificado usando uma gama de técnicas moleculares. Os transposons presentes em inúmeras cópias podem gerar centenas ou milhares de marcas. A presença ou ausência de um transposon em um dado loco pode ser usada como uma marca molecular para *fingerprinting* do genótipo, mapa de ligação e investigação em diversidade e filogenia. Para a identificação de inserção de transposon pode ser usada a técnica de PCR ou a hibridização (Grzebelus, 2006).

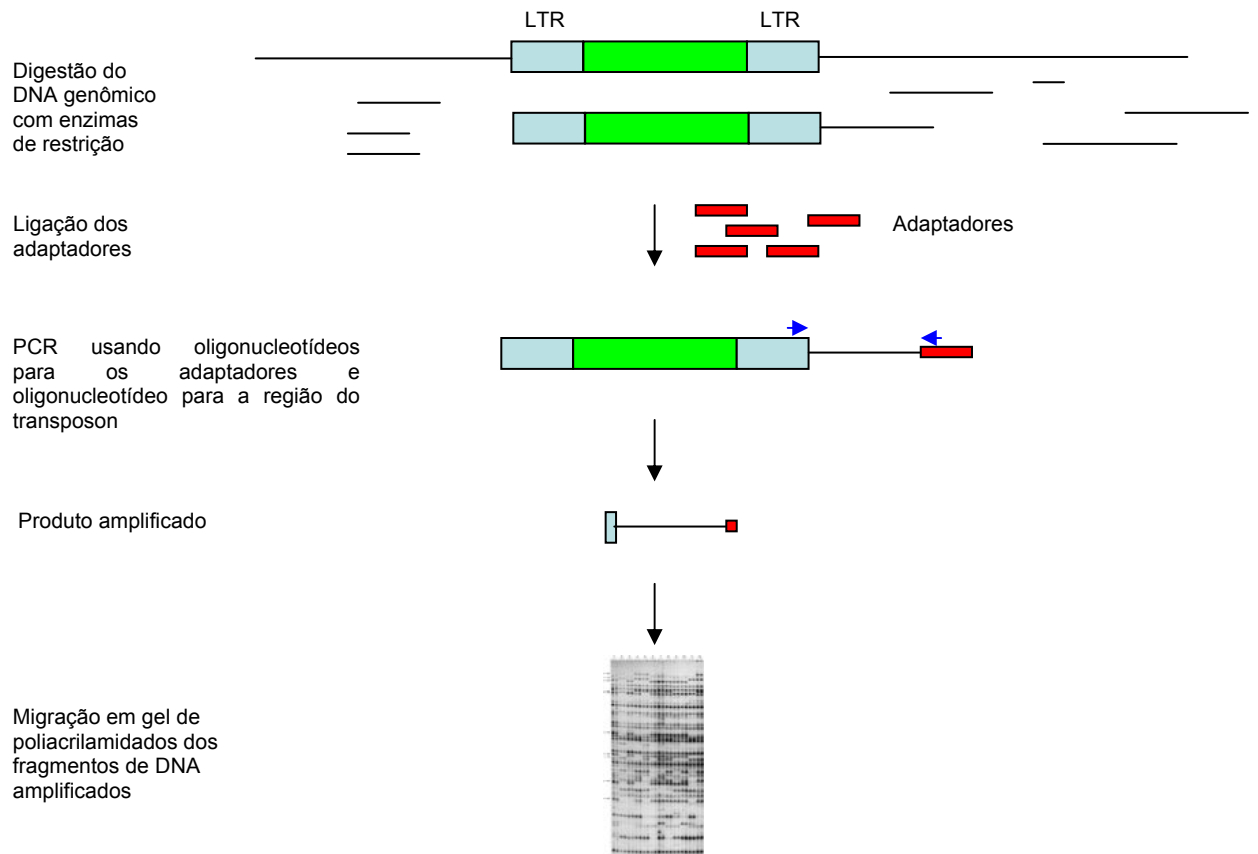
A estrutura e estratégia de replicação dos retrotransposons atribuem a eles várias vantagens como marcas moleculares. Primeiro, eles contém seqüências longas, definidas e conservadas que podem ser usadas para clonagem de marcas específicas e seqüências flanqueadoras. Segundo, a atividade de replicação de retrotransposons pode produzir novas inserções no genoma aumentando o polimorfismo. Essa nova inserção pode ser detectada e usada para análise filogenética. Grande parte do conhecimento da variabilidade dos genomas tem sido resultado de estudo de transposons em plantas, insetos, animais e fungos (Arkhipova *et al.*, 2003, Bouvet *et al.*, 2008, Crouch *et al.*, 2008, Rodriguez *et al.*, 2006, Taylor *et al.*, 2004). Atualmente, novas técnicas de *fingerprint* baseadas em retrotransposons têm sido utilizadas para estudos de diversidade genética: S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) (Waugh *et al.*, 1997), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.*, 1999), REMAP

(REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.*, 1999), inter-MITE polymorphism, IMP (Chang *et al.*, 2001); retrotransposon-based insertion polymorphism, RBIP (Favell *et al.*, 1998) entre outras. Dentre essas técnicas, três vêm sendo utilizadas mais freqüentemente como ferramentas para estudos de diversidade: S-SAP, IRAP e REMAP.

### **2.7.1 S-SAP**

Uma das técnicas de análise de polimorfismo mais utilizada para os retrotransposons *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy* é a S-SAP. Essa técnica foi proposta por Waugh *et al.* (1997), em cevada. Em principio essa técnica é uma modificação do AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). O final da amplificação é realizado com oligonucleotídeos específico para regiões conservadas de LTRs de retrotransposon e oligonucleotídeos para um adaptador (Grzebelus, 2006).

S-SAP explora a distribuição difusa dos transposons e pode ser usada para mapeamento molecular, seleção assistida e estudo de diversidade. A vantagem de se utilizar S-SAP é o alto nível de polimorfismo apresentado, mais codominância e melhor distribuição cromossomal do que o AFLP. No primeiro passo da técnica é realizada a digestão do DNA total com enzimas de restrição que não clivam o elemento transponível. Em seguida, adaptadores são ligados aos fragmentos de DNA. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação irão anelar na região do adaptador e na região conservada do LTR do transposon. O produto da amplificação pode ser então comparado entre os diferentes indivíduos, sendo que a presença de banda indica presença de elemento transponível e a ausência de bandas significa ausência de transposon em um determinado locos (Figura1) (Waugh *et al.*, 1997).



**Figura 1:** Esquema representando a técnica S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism).

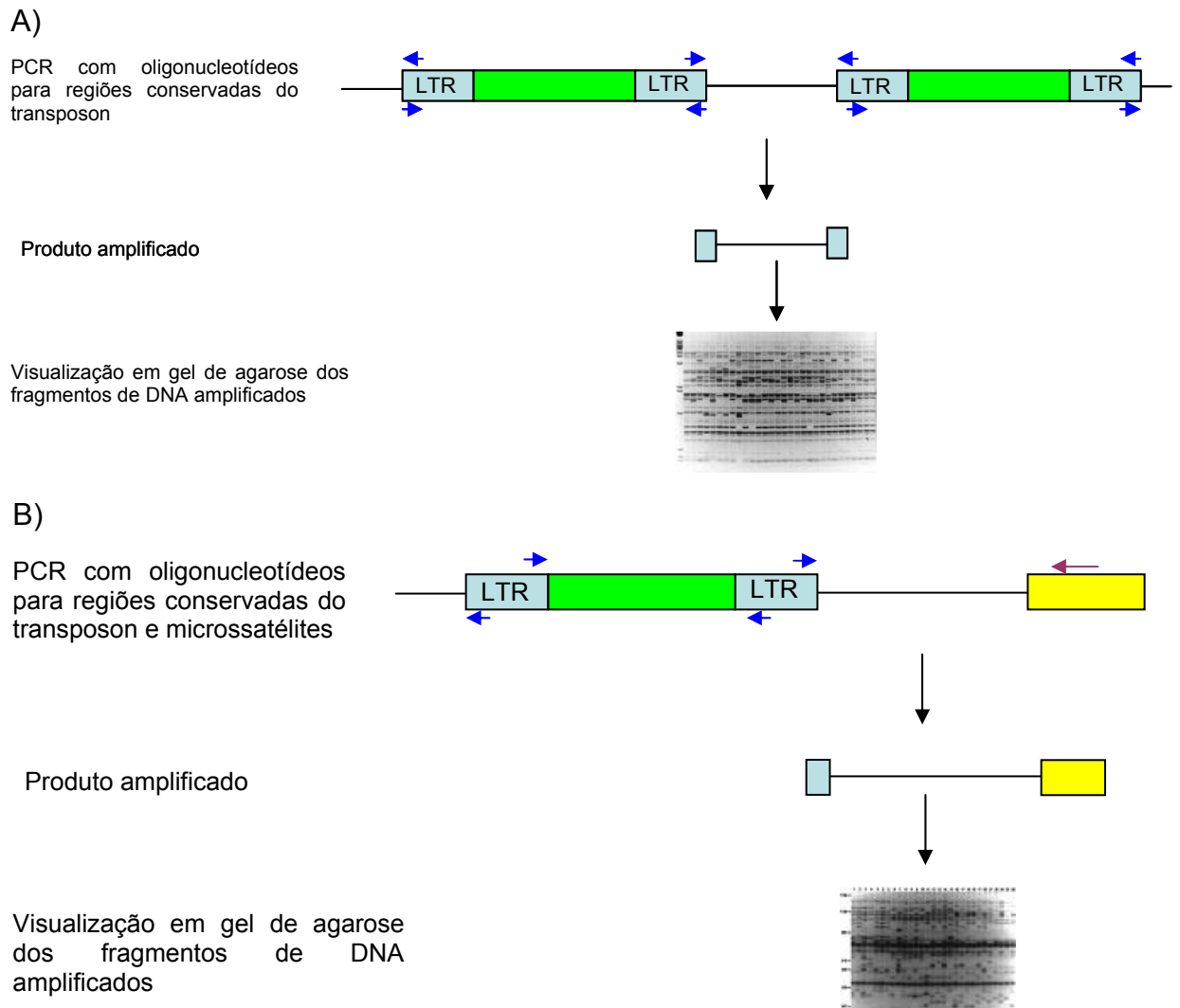
## 2.7.2 IRAP e REMAP

Diferentemente de S-SAP, tanto o IRAP quanto o REMAP possuem a vantagem de serem independentes da digestão do DNA por enzimas de restrição. As duas últimas técnicas examinam polimorfismo nas regiões onde estão inseridos os retrotransposons; IRAP entre retrotransposons e REMAP entre retrotransposons e microssatélites (SSR - Single Sequence Repeat). Em ambas as técnicas são desenhados oligonucleotídeos para regiões conservadas do retrotransposons, como as LTRs. Para o IRAP, os dois oligonucleotídeos irão anelar nas regiões conhecidas e conservadas do retrotransposon. No REMAP é utilizado um oligonucleotídeo que anela em um LTR em combinação com um oligonucleotídeo desenhado para anelar em SSR e desta forma detecta inserções de transposons perto de SSRs (Figura 2). Geralmente a técnica REMAP é capaz de distinguir melhor os indivíduos mais

proximamente relacionados do que o IRAP por levar em consideração o desenho de oligonucleotídeos para regiões de microssatélites que são conhecidas por estarem presente em grande número no genoma. Assim, o número de bandas detectadas por REMAP reflete melhor o número de LTRs examinadas no genoma e permite distinguir indivíduos mais próximos filogeneticamente. Uma das grandes vantagens de se utilizar marcadores com base em IRAP e REMAP pode ser a alta capacidade de rastrear eventos de inserção e sua subsequente verticalização por meio de um pedigree ou filogenia (Kalendar *et al.*, 1999).

Em um estudo comparativo de polimorfismo gerado por marcadores REMAP e ISSR, os resultados claramente demonstram o forte poder discriminatório de REMAP para estudos de variação genética em *M. grisea*. O resultado do estudo suporta a idéia de que a transposição é o mais importante mecanismo de geração de polimorfismo de DNA em *M. grisea*. O grande número de relatos da presença e dispersão de famílias de retrotransposons LTR em fungo sugere ampla aplicação de REMAP (Chadha & Gopalakrishna, 2007).

Essas duas técnicas, além de permitir o estudo de diversidade genética (Chadha & Gopalakrishna, 2005), rastreamento de espécies (Murata *et al.*, 2008) e estudos filogenéticos (Kalendar *et al.*, 1999) possibilitam ainda, a amplificação de seqüências específicas que podem ser usadas para diagnóstico molecular pela técnica de IR-SCAR (Inter-retrotransposon sequence-characterized amplified regions) (Pasquali *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Esquema representando a técnica: A) IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) e B) REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).

Assim, os elementos transponíveis podem representar ferramentas importantes para o estudo da biologia de fungos fitopatogênicos. A identificação e caracterização de um elemento transponível no genoma de fitopatógenos podem fornecer informações importantes sobre o mecanismo de transposição, a ativação desses elementos, sua distribuição horizontal e vertical, mecanismos de silenciamento gênico, organização do genoma hospedeiro e estudo de diversidade genética e populacional.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M. CASCARDO, J., FURTEK, D. B. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of Witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 105:167-175.
- ARKHIPOVA, I. R., MESELSON, M. 2004. Deleterious transposable elements and the extinction of asexual. **BioEssays** 27:76-85.
- BASTOS, C.N. & ANDERBRAHN T. 1986. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie da Vassoura-de-Bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira** 13:963-965.
- BOUVET, F. B. JACOBI, V., PLOURDE, K. V., BERNIER, L. 2008. Stress-induced mobility of OPHO1 and OPHO2, DNA transposons of the Dutch elm disease fungi. **Fungal Genetics and Biology** 45:565-578.
- BOWEN, N. J., JORDAN, L. K. 2002. Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. **Molecular Biology** 4: 65-76.
- BRAUMANN, I., BERG, M., KLEMPKEN, F. 2008. Repeat induced point mutation in two asexual fungi, *Aspegillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **Current Genetics** 53:287-297.
- BRONSON, C. R., TAGA, M., YODER, O. C. 1990. Genetic control and distorted segregation of the T-toxin production in field isolates of *Cochliobolus heterostrophus*. **Phytopathology** 80:819-823.
- BYRNES, K. J., PATAKY, J. K. WHITE, D. G. 1989. Relationships between yield of three maize hybrids and severity of southern leaf blight caused by Race O of *Bipolaris maydis*. **Plant Disease** 73:834-840.

- CAMBARERI, F. B., SINGER, M. J. E., SELKER, E. U. 1991. Recurrence of the repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. **Genetics** 127:699-710.
- CHADHA, S. & GOPALAKRISHNA, T. 2007. Comparative assessment of REMAP and ISSR markers assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. **Current Science** 93:688-692.
- CHADHA, S. & GOPALAKRISHNA, T. 2005. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe Grisea*). **Genome** 48:943-945.
- CHANG, R-Y, O'DONOUGHUE L. S.; BUREAU, T. E. 2001. Inter-Mite polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. **Theoretical and Applied Genetics** 102:773-781.
- CROUCH, J. A., GLASHEEN, B. M., GIUNTA, M. A., CLARKE, B. B., HILLMAN, B. I.. 2008. 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**. 45:190-206.
- DABOUSSI, M. J. & CAPY, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology** 57:275-299.
- DE ARRUDA, M. C. C., MILLER, R. N. G., FERREIRA, M. A. S. V., FELIPE, M. S. S. 2003b. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive sequence-based PCR genome fingerprinting. **Plant Pathology** 52:236-244.
- DRECHSLER, C. 1934. Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus *Cochliobolus*. **Phytopathology** 24:953-984.

- ETO, Y., IKEDA, K., CHUMA, I., KATAOKA, T., KURODA, S., KIKUCHI, N., DON, L. D., KUSABA, M., NAKAYASHIKI, H., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after sexual cycle. **Molecular General Genetics** 264: 567-577.
- FARMAN, M. L., TOSA, Y., NITTA, N., LEONG, S. 1996. MAGGY, a retrotransposon in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular General Genetics** 251:665-674.
- FLAVELL, A. J., KNOX, M. R., PEARCE, S. R., ELLIS, T. H. N. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. **Plant Journal** 16:643-650.
- FREITAG, M., WILLIAMS, R. L., KOTHE, G. O., SELKER, E. U. 2002 A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 99:8802-8807.
- GABRIEL, A. DAPPRICH, J., KUNKEL, M., GRESHAM, D., PRATT, S. C., DUNHAM, M. J. 2006. Global Mapping of transposon location. **Plos Genetics** 2:2026-2038.
- GAFUR, A., TANAKA, C., SHIMIZU, K., OUCHI, S., TSUDA, M. 1998. Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus*  $\beta$ -tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. **The Journal of General and Applied Microbiology** 44:217-223.
- GALANGAN, E. J., SELKER, E.U. 2004. Rip: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics** 20:417-422.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. 1994a. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity** 71:278-289.

- GRZEBELEUS, D. 2006. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research** 14:21-29.
- HANE, J. K. & OLIVER, R. P. 2008. RIPCAI: a tool for alignment-based analyses of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. **BMC Bioinformatics** 9:478, doi:10.1186/1471-2105-9-478.
- HAVECKER, E. R., GAO, X., VOYTAS, D. F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome Biology** 5:225.
- HOOD, M. E., KATAWCZIK, M., GIRAUD, T. 2005. Repeat-induced point mutation and the population structure of transposon elements in *Microbotryum violaceum*. **Genetics** 170:1081-1089.
- HUAN-VAN, A., ROUZIC, A. L., MAISONHAUTE, C., CAPY, P. 2005. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research** 110:426-440.
- IKEDA, K., NAKAYASHIKI, H., TAKAGI, M., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 266:318-325.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics** 98:704-711.
- KANG, S., LEBRUN, M. H., FARRALL, L., VALENT, B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **The American Phytopathology Society** 14:671-674.

- KAPITONOV, V. V. & JURKAR, J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 98:8714-8719
- KAZAZIAN, H. H. Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science** 303:1626-1632.
- KEMPKEN, F. & KÜCK, U. 2000. Tagging of a nitrogen pathway-specific regulator gene in *Tolypocladium inflatum* by the transposon Restless. **Molecular and General Genetics** 263:302-308.
- KINSEY, J. A., HELBER, J. 1989. Isolation of a transposable element from *Neurospora Crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86:1929-1933.
- KODAMA, M., ROSE, M. R., YANG, G., YUN, S. H., YODER, O. C., TURGEON, B. G. 1999. The translocation-associated Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. **Genetics** 151: 585-596.
- LABRADOR, M., FARRE, M., UTZEL, F., FONTDEVILA, A. 1999. Interspecific hybridization increases transposition rates of *Oswaldo*. **Molecular Biology and Evolution** 16:931-937.
- LOVSIN, N., F., GUBENSEK, KORDIS, D. 2001. Evolutionary dynamics in a novel L2 clade of non-LTR retrotransposons in Deuterostomia. **Molecular Biology and Evolution** 18:2213–2224.
- MARTIN, F., AERTS, A., AHRÉN, D., BRUN, A., DANCHIN, E. G. J., DUCHAUSSOY, F., GIBON, J., KOHLER, A., LINDQUIST, E., PEREDA, V., SALAMOV, A., SHAPIRO, H. J., WUYTS, J., BLAUDEZ, D., BUÉE, M., BROKSTEIN, P., CANBÄCK, B., COHEN, D., COURTY, P. E., COUTINHO, P. M., DELARUELLE, C., DETTER, J. C., DEVEAU, A., DIFAZIO, S., DUPLESSIS, S., FRAISSINET-TACHET, L., LUCIO, E., FREY-KLETT, P., FOURREY, C., FEUSSNER, I., GAY, G., GRIMWOOD, J., HOEGGER, P. J., JAIN, P., KILARU,

- S., LABBLÉ, J., LIN, Y. C., LEGUÉ, V., LE TACON, F., MARMEISSE, R., MELAYAH, D., MONTANINI, B., MURATET, M., NEHLS, U., NICULITA-HIRZEL, H., OUDOT-LE SECQ, M. P., QUENEVILLE, H., RAJASHEKAR, B., REICH, M., ROUHIER, N., SCHMUTZ, J., YIN, T., CHALOT, M., HENRISSAT, B., KÜES, U., LUCAS, S., VAN DE PEER, Y., PODILA, G. K., POLLE, A., PUKKILA, P. J., RICHARDSON, P. M., ROUZÉ, P., SANDERS, I. R., STAJICH, J. E., TUNLID, A., TUSKAN, G., GRIGORIEV, I. V. 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature** 452:8892.
- MURATA, H., BABASAKI, K., SAEGUSA, T. TAKEMOTO, K., YAMADA, A., OHTA, A. 2008. Traceability of Asian matsutake, specialty mushrooms produced by the ectomycorrhizal basidiomycetes *Tricholoma matsutake*, on the basis of retroelement-based DNA markers. **Applied and Environmental Microbiology** 74:2023-2031.
- NEUMANN, P., PAZARKOVA, D., MACAS, J. 2003. Highly abundant pea LTR retrotransposon Ogre is constitutively transcribed and partially spliced. **Plant Molecular Biology** 3:399-410.
- NICOSIA, M. G. L. D., BROCARD-MASSON, C., DEMAISS., HUA-HUAN, A. L., DABOUSSI, M. J., SCAZZOCCHIO, C. 2001. Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology** 39:1330-1344.
- NOVIKOVA, O. S., FET, V., VLINOV, A. G. 2007. Homology-dependent inactivation of LTR retrotransposons in *Aspergillus fumigatus* and *A. nidulans* genome. **Molecular Biology** 41:886-893.
- OLIVEIRA, M. L., LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.
- PANACCIONE, D. G., PITKIN, J. W., WALTON, J. D., ANNIS, S. L. 1996. Transposon-like sequences at the TOX2 locus of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. **Gene** 176:103-109.

- PASQUALI, M., DEMATHEIS, F., GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. 2007. Identification of Race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. **Phytopathology** 97: 987-996.
- PEREIRA, J. L. *et al.* 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotópica** 1:79-81.
- PEREIRA J. F. 2005. Caracterização, distribuição e estudo da atividade de elementos transponíveis em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacau (Theobroma cacao). Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Viçosa. 182p.
- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Phytopathology** 34:573-594.
- RINCONES, J., MEINHARDT, L. W., VIDAL, B. C., PEREIRA, G. A. G. 2003. Eletrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 107:452-458.
- ROUZIC, A. L. & CAPY, P. 2005. The first of transposable element invasion: parasitic strategy vs. genetic drift. **Genetics** 169:1033-1043.
- ROUZIC, A. L., BOUTIN, T. S., CAPY, P. 2007. Long-term evolution of transposable elements. **Evolution** 104:9375-19380.
- SELKER, E. U., CAMBARERI, E. B., JENSEN, B. C., HAACK, K. R. 1987. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell** 51:741-752.

- SELKER, E. U., TOUNTAS, N. A., CROSS, S. H., MARGOLIN, B. S., MURPHY, J. G., BIRD, A. P., FREITAG, M. 2003. The methylate component of the *Neurospora crassa* genome. **Nature** 422:893-897.
- SILVA, P. 1987. Cacau e lagartão ou vassoura-de-bruxa: registros efetuados por Alexandre Rodrigues Ferreira nos anos 1785 e 1787 na Amazônia. In: Ilhéus. CEPEC/CEPLAC, Boletim Técnico, n. 146, 21pp.
- SUÁREZ, C. C., DELGADO, A. J. C. 1993. **La escoba de bruja del cacao**. FUNDAGRO – INIAP, 21 p. (Boletín técnico, n. 11).
- TANAKA, C., TANIGUCHI, T., TSUDA, M. 1994. Genetic analysis of *Cochliobolus heterostrophus* beige mutants. **Mycological Research** 99:621-622.
- TAGA, M., TSUCHIYA, D., MURATA, M. 2003. Dynamic changes of rDNA condensation state during mitosis in filamentous fungi revealed by fluorescence in situ hybridization. **Mycological Research** 107:1012-1020.
- TURGEON, B. G., BOLMANN, H., CIUFFETTI, L. M., CHRISTIANSEN, S. K., YANG, G., SCHAFFER, Y., YODER, O. C. 1993. Cloning and analysis of the mating-type genes from *Cochliobolus heterostrophus*. **Molecular and General Genetics** 238:270-284.
- TZENG, T. H., LYNGHOLM, L. K.; FORD, C. F.; BRONSON, C. R. 1992. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics** 130:81-86.
- VILLALBA, F., LEBRUN, M. H., HUA-VAN, A., DABOUSSI, M. J., GROSJEAN-COURNOYER, M. C. 2001. Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14:308-315.

- YANG, G., ROSE, M. S., TURGEON, B. G., YODER, O. C. 1996. A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. **The Plant Cell** 8:2139-2150.
- WALLIN, J. R. & LOONAN, D. V. 1977. Temperature and humidity association with sporulation of *Helminthosporium maydis* Race T. **Ecology and Epidemiology** 67:1370-1372.
- WAUGH, R., MCLEAN, K., FLAVELL, A. J., PEARCE, S. R., KUMAR, A., THOMAS, B. B., POWELL, W. 1997. Genetic distribution of *BARE-1* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). **Molecular Genetics and Genomics** 253:687-694.
- WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B., RESENDE, M. A., VALÉRIO, H. M., CALIGIORNE, R. B., PAIVA, E. 2002. Genetic variation among pathogens causing “*Helminthosporium*” diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia Brasileira** 27:639-643.
- WICKER, T., SABOT, F., HUAN-VAN, A., BENNETZEN, J. L., CAPY, P., CHALHOUB, B., FLAVELL, A., LEROY, P., MORGANTE, M., PANAUD, O., PAUX, E., SANMIGUEL, P., SCHULMAN, A. K. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews** 8:973-982.
- WRIGHT, S & FINNEGAN, D. 2001. Genome evolution: sex and transposable element. **Dispatch** 11:296-299.
- ZEYL, C., BELL, G., GREEN, D. M., 1996. Sex and the spread of retrotransposon *Ty3* in experimental populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 143:1567-1577.

## CAPÍTULO I

USO DO RETROTRANSPOSON *MpSaci* DE *Moniliophthora perniciosa*,  
AGENTE CAUSAL DA VASSOURA DE BRUXA NO CACAUEIRO  
(*Theobroma cacao*) COMO MARCADOR MOLECULAR

## 1-RESUMO

*Moniliophthora perniciosa* é o agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*) e apresenta diferentes elementos transponíveis em seu genoma. Um dos elementos encontrados foi um retrotransposon do grupo *Gypsy/Ty3* denominado de *MpSaci*. Retrotransposons são induzidos por diferentes condições de estresse e são controlados por diferentes mecanismos de silenciamento. Devido a ampla distribuição de elementos transponíveis no genoma de *M. perniciosa*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de *MpSaci* para estudo populacional com os marcadores moleculares IRAP e REMAP. Foram utilizados os marcadores IRAP e REMAP para estudar a diversidade genética de 70 isolados de *M. perniciosa* de diferentes biótipos e origens geográficas. Foram amplificados 43 locos. Os índices de Nei mostraram diferenças significativas entre as populações de *M. perniciosa* divididas em relação ao biótipo e origem geográfica, demonstrando que as populações se encontram estruturadas em relação a origem geográfica e ao hospedeiro (biótipo). Pela análise de agrupamento de diferentes regiões geográficas do biótipo C foram observados dois grandes grupos que evidenciam duas principais entradas do patógeno no estado da Bahia.

## 2- INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é afetado por várias doenças de grande importância econômica. A podridão-parda dos frutos do cacauzeiro ou podridão-de-phytophthora, causada por *Phytophthora* spp., é em termos mundiais a principal delas, pois ocorre em todos os países produtores de cacau. Entretanto, no Brasil, a vassoura-de-bruxa causada por *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) é a doença mais devastadora (Neto *et al.*, 2005).

*Moniliophthora perniciosa* infecta os lançamentos foliares, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais podendo, até, provocar a morte da planta quando esta é afetada por sucessivos ciclos do patógeno associados a fatores abióticos (Queiroz *et al.*, 2003). Uma das alternativas encontradas para o manejo da vassoura-de-bruxa é o emprego de variedades resistentes e com alta produtividade, desenvolvidas em programa de melhoramento genético do cacauzeiro. Essa medida de controle é fundamental, haja visto os controles químico e culturais terem se mostrado onerosos e ineficazes quando não executados rigorosamente de acordo com as recomendações técnica, e antieconômicos em se tratando de lavouras formadas por variedades de alta suscetibilidade e de baixa produtividade (Pinto & Pires, 1998). Além disso, o controle químico pelo seu efeito na microbiota, eliminando inimigos naturais, pode ocasionar agravamento de outras doenças e pragas, além de possibilitar a seleção de isolados resistentes.

A variabilidade dentro de *M. perniciosa* tem sido detectada quando isolados de diferentes origens são comparados. Tal variabilidade é detectada no crescimento micelial em meios de cultura, tipos de reação em alguns testes bioquímicos, compatibilidade somática e patogenicidade ao cacauzeiro e a outros hospedeiros (Oliveira & Luz, 2005).

A larga gama de hospedeiro tem incitado vários autores a propor um sistema de classificação baseado em especificidade de hospedeiro: o biótipo C infecta espécies de *Theobroma* e *Herrania* (Malvaceae); o biótipo S afeta vários membros de *Solanaceae*, o biótipo L é encontrado em videiras e é heterotático, o biótipo B infecta *Bixa orellana*. Os biótipos C e S causam os típicos sintomas de vassoura-de-bruxa em seus hospedeiros, enquanto o biótipo L não causa sintomas (Bastos & Anderbrahn, 1986; Griffith & Hedger, 1994 a).

Após quase 20 anos de convivência com a vassoura-de-bruxa, a lavoura cacaujeira começa a dar sinais de recuperação devido à utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a maioria deles, descende de uma única fonte de resistência, o clone Scavina-6. Isso pode levar à suplantação da resistência devido a variabilidade genética do fungo. Assim, é de extrema importância estudar e monitorar a variabilidade do fungo nos locais de desenvolvimento dos programas de melhoramento genético e naqueles onde se pretende introduzir o material resistente (Neto *et al.*, 2005).

Análises empregando os marcadores RFLP de DNA mitocondrial, ITS e IGS da região do rDNA refletem alto grau de variabilidade genética (Griffith & Hedger, 1994b). Outras ferramentas têm sido utilizadas como RAPD (Andebrhan *et al.*, 1999), ERIC-PCR (De Arruda *et al.*, 2003b) e cariotipagem molecular (Rincones *et al.*, 2003), entretanto, os resultados não foram correlacionados. Em geral, a variabilidade entre isolados do biótipo C na Amazônia é maior que entre os isolados da Bahia. Isso evidencia que provavelmente o material introduzido na Bahia tenha se originado de isolados da Amazônia (De Arruda *et al.*, 2003b).

Um dos processos conhecidos que pode gerar variabilidade em fungos fitopatogênicos é a atividade de elementos transponíveis. Esses podem ser os principais responsáveis pela alta adaptabilidade e plasticidade apresentada por muitas espécies de fungos. A atividade do transposon pode estar associada a estresse ambiental como forma de resposta adaptativa do genoma (Daboussi & Capy, 2003). Vários transposons em plantas e fungos são ativados sob condições de estresse, tais como temperatura, irradiação, estresse oxidativo e ciclo sexual (Eto *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2001). Entretanto, o genoma hospedeiro possui mecanismos de silenciamento gênico para combater os eventos de transposição, como RIP (Repeat-Induced Point Mutation) (Selker *et al.*, 1987). A RIP induz mutações GC para AT em seqüências duplicadas de DNA que possuam mais de 400 pares bases e com identidade maior que 80% (Novikova, *et al.*, 2007).

A análise de transposon de espécie fitopatogênica pode contribuir para estudos evolutivos e de transferência genética. Esses elementos podem ser utilizados como marcadores para traçar o perfil de populações (Murata *et al.*, 2008) e para rastreamento e identificação de raças específicas de patógenos (Pasquali *et al.*, 2007). Com o advento do seqüenciamento do genoma de *M. perniciosus* fomentado

pelo Projeto Genoma de *M. pernicioso* ([www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura)) foi possível encontrar no genoma desse fungo, seqüências de representantes dos diferentes grupos de elementos transponíveis. Um desses elementos foi denominado *MpSaci* e pertence ao grupo *Gypsy/Ty-3*, que é o principal grupo encontrado em fungos fitopatogênicos (Pereira, 2005).

Devido a importância que o retrotransposon *MpSaci* pode ter na geração de variabilidade genética em *M. pernicioso*, nesse trabalho foi investigada a estrutura genética do fungo nas diferentes regiões produtoras de cacau pela análise do perfil de bandas gerados por dois marcadores moleculares: IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polimorphism) e REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.*, 1999).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenções de isolados de *Moniliophthora perniciosa*

Foram utilizados 36 isolados de *M. perniciosa* pertencentes a Coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e 34 isolados pertencentes a coleção de culturas da Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB) de diferentes regiões do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram coletados entre o período de 2001 e 2003. As populações foram divididas conforme região e biótipo do patógeno.

**Tabela 1:** Isolados de *M. pernicioso* utilizados no trabalho.

Isolados	Identificação na coleção	Biótipo	Localização	Hospedeiro	Instituição
1	DOA 100	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	-
2	Santo Amaro	C	Santo Amaro/ BA	<i>Theobroma cacao</i>	UNB
3	Belmont	C	Belmont/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFB
4	ALF 276	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
5	ALF 42	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
6	ALF 301	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
7	ALF 305	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
8	ALF 278	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
9	SABA	C	Santo Amaro/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFLA
10	Ilhéus	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFB
11	FA 281	C	Aiquara/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
12	FA 563	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
13	FA 317	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
14	FA 42	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
15	CP02	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UESC
16	1734 D-W	C	Gandu/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
17	676 G D-W	C	Floresta Azul/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
18	896 FD-W	C	Jaquaquara/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
19	606 G D-W	C	Itabuna	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
20	948 F D-W	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
21	ALF1477	C	Mucuri/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
22	ALF 1578	C	Mucuri/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
23	ALF 1579	C	Mucuri/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
24	ALF 321	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
25	ALF 1140	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
26	FA 277	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
27	FA 563	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
28	DOA102	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	-
29	ALF 110	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
30	MP 227	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
31	MP 1181	C	Gandú/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
32	MP 1105	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
33	MP 1102	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
34	MP 1158	C	Ibitrapitanga/bA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
35	MP 553	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB

36	MP 1160	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
37	MP 310	C	Itagi/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
38	MP 1138	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
39	MP 307	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
40	MP 1170	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
41	MP 1146	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
42	MP 1180	C	Gandú/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
43	MP 1172	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
44	MP 1159	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
45	MP 1140	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
46	MP 1185	C	Gandú/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
47	MP 1096	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
48	MP 1183	C	Gandú/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
49	MP 314	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
50	MP 316	C	Pau-Brasil/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
51	MP 179	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
52	MP 1178	C	Ipiaú/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
53	MP 1191	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
54	MP 1173	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
55	MP 1169	C	Ilhéus/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
56	MP 285	C	Ubaitaba/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
57	MP 1157	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
58	MP 320	C	Buerarema/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
59	MP 277	C	Itajuipé/BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
60	MP 283	C	Lomanto Jr/ BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
61	MP 1193	C	Ouro Preto/RO	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
62	MP 1194	C	Jarú/RO	<i>Theobroma cacao</i>	UFRB
63	FA 551	C	Tabatinga/AM	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
64	ALF 551	C	Tabatinga/AM	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
65	LA17	L	San Carlos/Equador	<i>Arrabidaea verrucosa</i>	UW
66	SCL4	L	Pichilingue/Equador	<i>Arrabidaea verrucosa</i>	UW
67	FA 607	S	Coimbra/MG	<i>Solanum/Lycocarpum</i>	FAC
68	FA 609	S	Poços de Caldas/MG	<i>Solanum SP</i>	FAC
69	RWB 500	S	Rio Pomba/MG	<i>Solanum cernum</i>	UFV
70	RWB 551	S	Juiz de Fora/ MG	<i>Solanum lycocarpum</i>	UFV

FAC (fazenda Almirante Cacau) em Itajuipé, Bahia, Brasil, UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) em Ilhéus, Bahia, Brasil, UNB (Universidade de Brasília) em Brasília, Distrito Federal, Brasil, UFLA (Universidade Federal de Lavras) em Lavras, Minas Gerais, Brasil, UFRB ( Universidade Federal do Recôncavo Baiano), na Bahia, Brasil, CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura do Cacau) em Ilhéus, Bahia, Brasil, UW ( University of Wales), em Aberystwyth, U.K

### 3.2 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada usando o kit de extração UltraClean™ Microbial DNA Isolation da Mo BIO laboratories, Inc. A qualidade e quantidade do DNA total foram avaliadas por espectrofotômetro e confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O DNA purificado foi utilizado imediatamente e armazenado a -20 °C.

### 3.3 IRAP e REMAP

Foram utilizadas as técnicas IRAP e REMAP (Kalendar *et al.*, 1999) para a obtenção de marcas polimórficas para os biótipos C, S e L de *M. perniciosus*. Para ambas as técnicas foram desenhados oligonucleotídeos para regiões conservadas de LTRs do retrotransposon *MpSaci*. Para o IRAP, foram utilizados dois oligonucleotídeos para a região LTR de *MpSaci*. Para o REMAP foram usados oligonucleotídeo para a LTR em combinação com oligonucleotídeo que anelam em SSR (Single Sequence Repeat) e desta forma foi possível detectar inserções de transposons próximos aos SSRs. Os oligonucleotídeos para microssatélites foram desenhados de acordo com o artigo de Gramacho *et al.* (2007). Abaixo seguem as combinações de oligonucleotídeos utilizadas no experimento.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Técnica	Identificação	Seqüência (5' _3')
IRAP	CPLTR1/R	GTGCAAGCGACACACAAACT
	CPLTR2/R	GCAGTGTTTCTACAGCGAAG
REMAP	CPLTR1/F	CTCGCTTCTTCAGCTTGACC
	CPLTR1/R	GTGCAAGCGACACACAAACT
	CPLTR2/R	GCAGTGTTTCTACAGCGAAG
	MS1	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCT
	MS2	ATGATGATGATGATGATGATGG
	MS4	CACACACACACACACACAG

Reações de IRAP e REMAP foram realizadas em um volume de 25 µl de reação contendo 1x thermophilic DNA poly buffer (Promega), MgCl<sub>2</sub> 2,0 mmol/L (Promega), 100 µmol/L de cada dNTP, 0,2 µmol/L de cada oligonucleotídeo, 40 ng de DNA e uma unidade de Taq DNA polimerase (Promega).

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-100-MJ Research programado para realizar 6 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C e 2 minutos a 72 °C. A estes seis ciclos iniciais foram adicionados mais 24 ciclos sendo que a cada seis ciclos eram somado 30 segundos ao tempo de extensão. O passo de extensão final foi de 10 minutos a 72 °C.

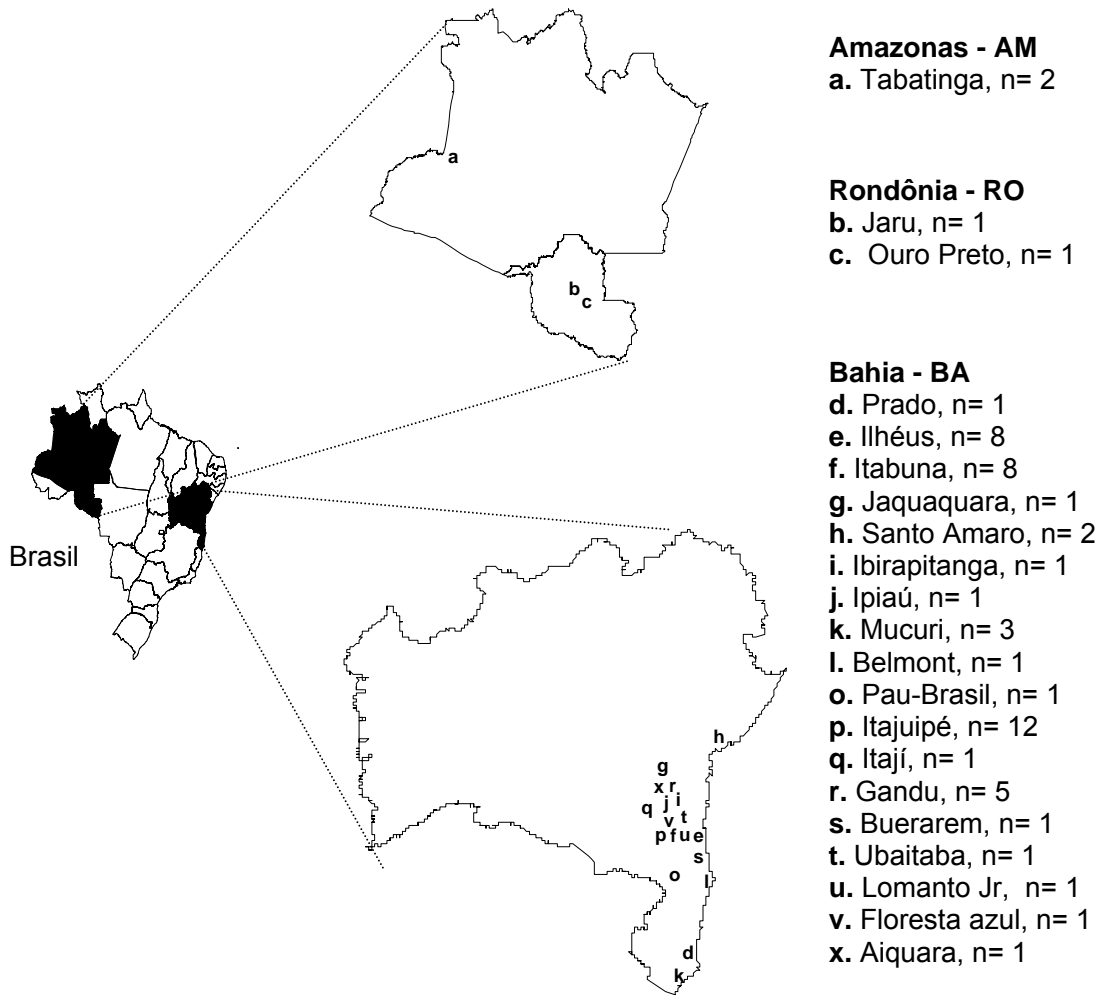
### 3.4 Análises dos amplicons gerados

Diferenças nos padrões de amplicons entre os isolados foram avaliadas visualmente. As bandas para cada combinação respectiva de iniciadores utilizados na amplificação seletiva foram identificadas com o número um (presença) e zero (ausência). Bandas comuns a todos os isolados foram incorporadas a análise. A reprodutibilidade do perfil de bandas do DNA foi testada por repetição da PCR com cada um dos primers selecionados. Somente bandas com reprodutibilidade foram consideradas para a análise.

A distância genética entre os isolados foi calculada utilizando a distância genética de Nei (Nei, 1973). Baseado neste coeficiente foi construído um dendograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não-ponderados (UPGMA) utilizando o programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2006). Este programa também foi utilizado para o cálculo da análise de variância molecular (AMOVA).

A estrutura genética das populações foi avaliada pelos cálculos da diversidade gênica de Nei (1973). Para isso os isolados foram agrupados em três populações com base no hospedeiro de origem (biótipo L, biótipo S e biótipo C) e em 21 populações com base no município de origem (Figura 1). Foram calculados: diversidade gênica total ( $H_T$ ), diversidade gênica dentro da população ( $H_S$ ) e diferenciação genética entre as populações ( $G_{ST}$ ), número de migrantes ( $N_m$ ) par a par entre as populações. A diversidade genotípica foi estimada pelo índice de *Shannon-Wiener*  $H'$  (Hill, 1973). Para essas análises foi utilizado o programa

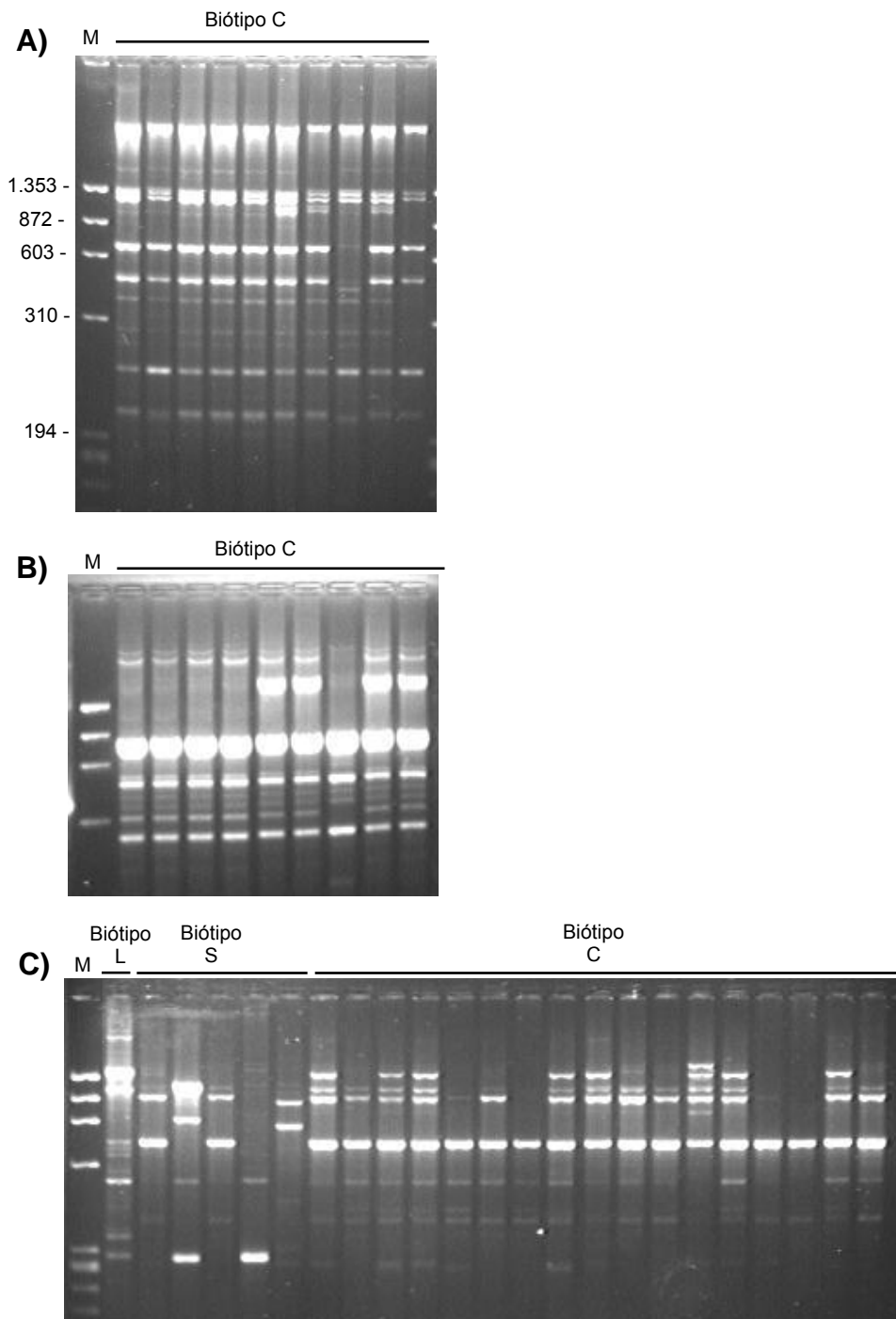
POPGENE (Yeh *et al.*, 1999). A evidência de acasalamento aleatório nas populações de *M. pernicioso* foi inferida pelo Índice de Associação (IA) (Maynard Smith *et al.*, 2003) utilizando o programa Multilocus 1.3 (Agapow & Burt, 2001).



**Figura 1:** Origem geográfica e número (n) de isolados amostrados por região geográfica.

## 4 – RESULTADOS

O número de produtos amplificados obtidos foi específico para cada conjunto de oligonucleotídeos. Baseado no padrão eletroforético combinado de IRAP e REMAP foi observado um polimorfismo de 46,51%. Um total de 43 locos foram amplificados. A combinação de primers CPLTR1/F e MS2 foi a que gerou polimorfismo mais acentuado (80%) nos isolados do biótipo C oriundos da Bahia (Figura 2C). Ao todo foram encontrados 24 haplótipos no biótipo C. Entre os haplótipos amostrados na Bahia, 14 eram singletons.



**Figura 2:** Perfil eletroforético do DNA de *Moniliophthora perniciosa* gerado por IRAP (A) e REMAP (B e C). (B) resultado da combinação dos oligonucleotídeos CPLTR2/R e MS1; (C) resultado da combinação dos oligonucleotídeos CPLTR1/F e MS2. A letra M indica marcador de tamanho  $\Phi$ X174/ Hae III.

A diversidade gênica média de Nei (h) foi maior em relação aos biótipos (h= 0,28, n= 70) do que em relação a origem geográfica (h= 0,06, n= 64). O coeficiente de diferenciação genética de Nei (Gst) médio para biótipos foi de 0,52, inferior ao obtido para origem geográfica que foi de 0,84. O número médio de migrantes foi de 0,4538 em relação aos biótipos e 0,09 em relação à origem geográfica (Tabela 3). O índice de associação foi não significativo em relação aos diferentes biótipos e origem geográfica com probabilidade menor que 0,001.

**Tabela 3:** Estimativas de diversidade genética de populações de *Moniliophthora perniciosa* por biótipos e origem geográfica.

Níveis de hierarquia	n	H <sub>t</sub>	H <sub>s</sub>	SH	Gst	Nm	I <sub>A</sub>
Biótipo	70	0,2858	0,1360	0,2280	0,5242	0,4538	1,66
Municípios	64	0,0597	0,0114	0,1008	0,8414	0,0943	6,408

n= número de indivíduos

H<sub>t</sub>= diversidade total

H<sub>s</sub>= diversidade dentro de população.

Gst= diferenciação genética entre populações

Nm= número de migrantes

SH= Índice de Shannon

I<sub>A</sub>= Índice de associação

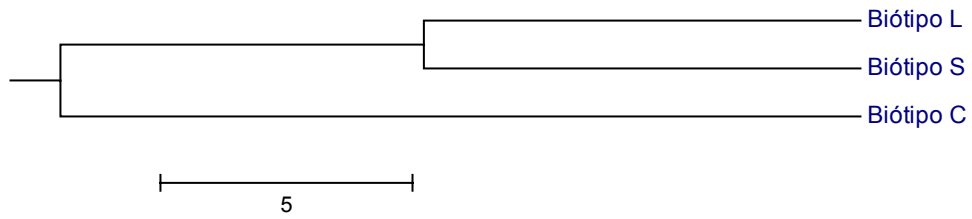
A AMOVA foi utilizada para acessar a variação encontrada entre e dentro das 6 populações que possuíam número de haplótipos variando entre 2 a 12. Foi observado que 73,7% da variação genética encontrada entre isolados está dentro das populações locais (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise de variância molecular (AMOVA): variação atribuída para diferenças entre e dentro de populações de diferentes origens geográficas de *Moniliophthora perniciosa* biótipo C.

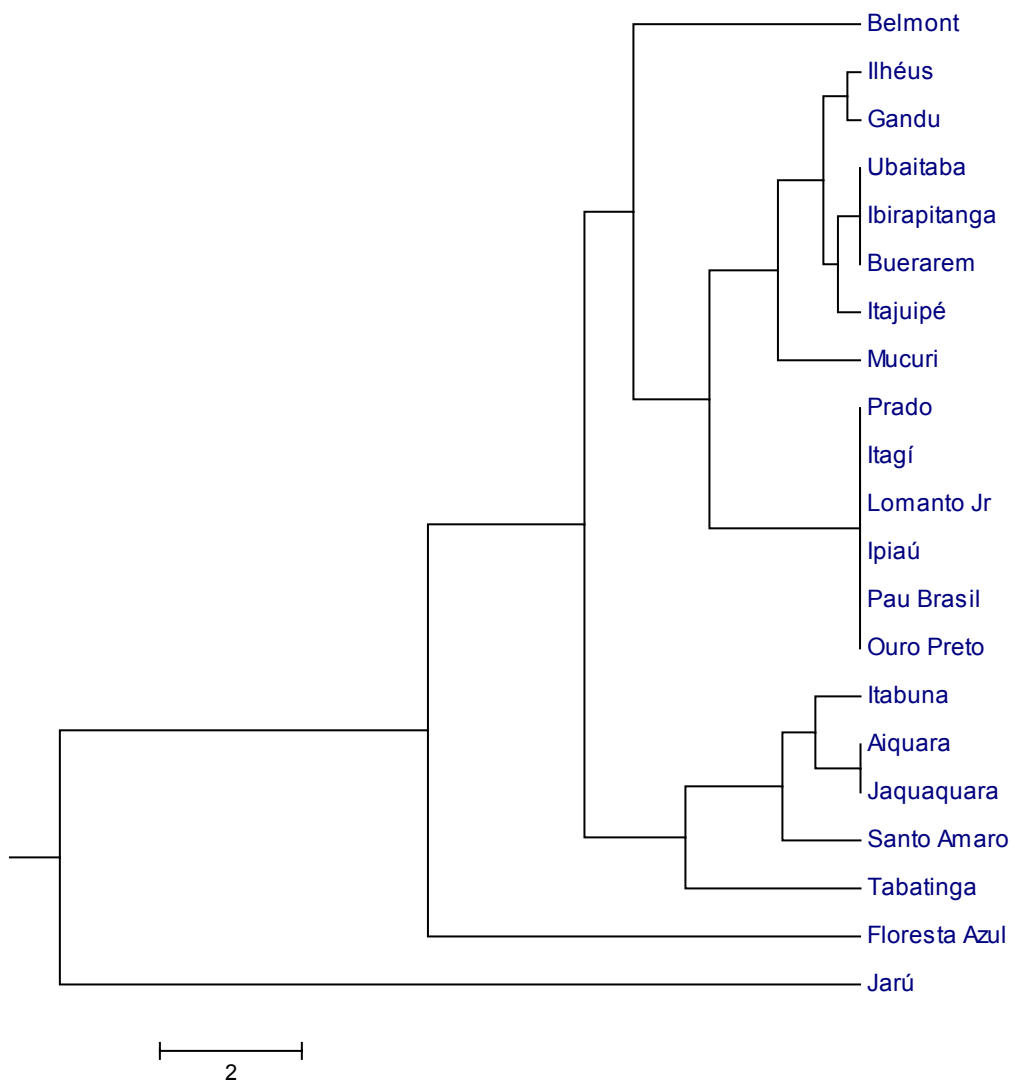
<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Componentes da Variância</b>	<b>Varição (%)</b>
Entre Populações	5	16,6	0,4Va	26,3
Dentro de Populações	32	34	1,0Vb	73,7
<i>Total</i>	37	50,6	1.4	100

Na análise por agrupamento houve clara separação entre as populações do biótipo S e L do biótipo C. Em relação ao agrupamento por municípios, houve dois grupos em destaques. O primeiro incluindo municípios da Bahia e de Rondônia (Ouro Preto) e o segundo agrupando municípios da Bahia e da amazonas (Tabatinga). Um terceiro ponto relevante diz respeito a população de Jarú em Rondônia que claramente possui um grande diversidade genética em relação aos demais municípios ( Figura 3).

A)



B)



**Figura 3:** Dendrograma (UPGMA) com base na análise dos marcadores IRAP e REMAP em populações de *M. pernicioso* divididas em biótipos e origem geográfica. (A) representa agrupamento encontrado em relação a três diferentes biótipos; (B)

representa o agrupamento encontrado em relação a deferentes municípios da Bahia, Rondônia e Amazonas.

## 5-DISCUSSÃO

Devido à capacidade de se mover no genoma do hospedeiro, os elementos transponíveis podem exercer significativa influência sobre a adaptação e potencial evolutivo de seus hospedeiros por meio de eventos como inserção mutacional, interrupção de genes e potencialização da expressão gênica ou ainda levar a rearranjos cromossomais (Hua-Van *et al.*, 2005).

No corrente trabalho IRAP e REMAP foram capazes de diferenciar os isolados de *M. pernicioso* de acordo com o hospedeiro de origem (biótipo). Este é o primeiro relato do uso das técnicas IRAP e REMAP no estudo de variabilidade genética de *M. pernicioso*. A técnica ERIC-PCR também foi capaz de diferenciar isolados de *M. pernicioso* de diferentes hospedeiros, entretanto outras técnicas como IGS RFLP não conseguiram diferenciação entre os diferentes biótipos (De Arruda *et al.*, 2003a, De Arruda *et al.*, 2003b). As técnicas IRAP e REMAP obtiveram 14% a mais de polimorfismo que o encontrado por Andebrhran e Furtek quando utilizaram RAPD para analisar a diversidade de *M. pernicioso* em diferentes hospedeiros (Andebrhran & Furtek, 1994) e nove haplótipos a mais que o encontrado por Ploetz quando utilizou se de AFLP para análise de diversidade molecular de *M. pernicioso* (Ploetz *et al.*, 2005). As técnicas moleculares baseadas em retrotransposons geram polimorfismos suficientes para diferenciar populações de *M. pernicioso*.

Tanto IRAP quanto REMAP revelaram considerável variação intra-específica de *M. pernicioso* provenientes de *Theobroma cacao* de diferentes regiões geográficas. No dendograma formado (Figura 3) foram identificadas claramente duas populações no estado da Bahia, sendo que os isolados de Ouro Preto do Oeste (Rondônia) e Tabatinga (Amazonas) clusterizaram separadamente nestas duas populações da Bahia sugerindo que houve duas introduções de *M. pernicioso* no estado da Bahia. Estes resultados são condizentes com os encontrados por Anderhan *et al.* (1999).

Conforme estatística de Nei ( $H_t$ ,  $H_s$  e  $G_{st}$ ), acessadas nas populações subdivididas por região geográfica, houve diferenciação significativa entre as populações de *M. perniciosa*, mesmo em cidades próximas. Além disso, o alto índice de associação ( $I_A$ ) entre os isolados demonstra que estas populações não estão em equilíbrio de ligação e desta forma desviam do acasalamento aleatório. Os valores de AMOVA demonstram que a diversidade de isolados foi maior dentro das populações do que entre as populações, onde 73,7% da diversidade foi encontrada dentro da população. Isso se deve principalmente a existência de vários singletons dentro de cada população. Desta forma, as populações de *M. perniciosa* estão estruturadas quanto ao biótipo e origem geográfica.

Em conclusão, as técnicas REMAP e IRAP podem gerar numerosas marcas polimórficas para uso em estudos de variabilidade genética. O conhecimento da variabilidade deste patógeno é de fundamental importância para o controle da doença e para o sucesso de programas de melhoramento do cacaueteiro para resistência a *M. perniciosa*.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPOW, P-M. & BURT. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**. 1:101-102.
- ANDERHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M., CASCARDO, J., FURTEK, D. B. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of Witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 105:167-175.
- ANDEBRHAN , T. & FURTEK, D. B. 1994. Random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology** 43:1020-1027.
- BASTOS, C.N. & ANDERBRAHN T. 1986. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie da Vassoura-de-Bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira** 13:963-965.
- DABOUSSI, M. J. & CAPY, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology** 57:275-299.
- DE ARRUDA, M. C. C., FERREIRA, M. A. S. V., MILLER, R. N. G., RESENDE, M. L. V., FELIPE, M. S. S. 2003a. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research** 107:25-37.
- DE ARRUDA, M. C. C., MILLER, R. N. G., FERREIRA, M. A. S. V., FELIPE, M. S. S. 2003b. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive sequence-based PCR genome fingerprinting. **Plant Pathology** 52:236-244.
- ETO, Y., IKEDA, K., CHUMA, I., KATAOKA, T., KURODA, S., KIKUCHI, N., DON, L. D., KUSABA, M., NAKAYASHIKI, H., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Comparative

- analyses of the distribution of various transposable elements in *Pycularia* and their activity during and after sexual cycle. **Molecular General Genetics** 264: 567-577.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. 2006. Arlequin ver 3.01. An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and molecular population genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne.
- GRAMACHO, K. P., RISTERUCCI, A. M., LANAUD, C., LIMA, L. S., LOPES, U. V. 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Ecology** 7:153-155.
- GRIFFITH, G. W. & HEDGER, J. N. 1994a. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity** 71:278-289.
- GRIFFITH, G. W. & HEDGER, J. N. 1994b. Spatial distribution of mycelia of the liana (L- ) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytologist** 127:243-259.
- HILL, M. O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology** 54:427-432.
- HUAN-VAN, A., RUZIC, L., MAISONHAUTE, C., CAPY, P. 2005. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research** 110:426-440.
- IKEDA, K., NAKAYASHIKI, H., TAKAGI, M., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Heat shock, Cooper sulfate and oxidative stress active the retrotransposon MAGGY resident in the pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 266:318-325.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics** 98:704-711.

- MAYNARD SMITH, L., SMITH, N. H., O'ROURKE, M., SPRATT, B. G. 1993. How clonal are bacteria? **Proceeding of the National Academy of Sciences**. 90:4384-4388.
- MURATA, H., BABASAKI, K., SAEGUSA, T., TAKEMOTO, K., YAMADA, A., OHTA, A. 2008. Traceability of Asian Matsutake, specialty mushrooms produced by the ectomycorrhizal basidiomycetes *Tricholoma matsutake*, on the basis of retroelement-based DNA markers. **Applied and Environmental Microbiology** 74(7):2023-2031.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 70:3321-3323.
- NEI, M; Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 76:5269-5273.
- NETO, A. D., CORRÊA, R. X., MONTEIRO, W. R., LUZ, E. D. M. N., GRAMACHO, K. P., LOPES, U. V. 2005. Characterization of a cocoa population for mapping of genes of resistance to Witches' Broom and *Phytophthora* pod rot. **Fitopatologia Brasileira** 30:380-386.
- NOVIKOVA, O. S.; FET, V.; VLINOV, A. G. 2007. Homology-dependent Inactivation of LTR retrotransposons in *Aspergillus fumigatus* and *A. nidulans* genome. **Molecular Biology** 41(6):886-893.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 132p.
- PASQUALI, M., DEMATHEIS, F., GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. **Phytopathology** 97:987-996.

- PEREIRA J. F. 2005. Caracterização, distribuição e estudo da atividade de elementos transponíveis em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacau (Theobroma cacao). Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Viçosa. 182p.
- PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de Plantas de Cacau. Resistentes à Vassoura-de-bruxa. Ilhéus. CEPLAC/CEPEC.1998.
- PLOETZ, R. C., SCHNELL, R. J., TING, Z., ZHENG, Q., OLANO, C. T., MOTAMAYOR, J. C., JOHNSON, E. S. 2005 Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology** 111:317-326.
- QUEIROZ, V.T., GUIMARÃES, C. T., ANHERT, D., SCHSTER, I., DAHER, R. T., PEREIRA, M. G., MIRANDA, V. R. M., LOQUERCIO, L. L., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. 2003. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding** 122:268-272.
- RINCONES, J., MEINHARDT, L. W., VIDAL, B. C., PEREIRA, G. A. G. 2003. Eletrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 107:452-458.
- SELKER, E. U., CAMBARERI, E. B., JENSEN, B. C., HAACK, K. R. 1987. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell** 51:741-752.
- YEH, F. C., YANG, R., BOYLE, T. 1999. POPGENE. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada.

## CAPÍTULO II

### **SOPHIE, RETROTRANSPOSON DO GRUPO *Gypsy/Ty3* NO FITOPATÓGENO *Cochliobolus heterostrophus*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA FOLIAR EM MILHO**

## 1. RESUMO

Uma busca no banco genômico de *Cochliobolus heterostrophus* utilizando como palavra chave “reverse transcriptase” permitiu a identificação de sete cópias intactas de um elemento transponível denominado *Sophie*. *Sophie 1* foi escolhido como retrotransposon modelo para as análises. Os elementos pertencem ao grupo *Gypsy/Ty3* e variaram de 7.426 a 7.512 pb com identidade de 91%. *Sophie 1* apresenta repetições terminais longas (LTRs) idênticas de 494 pb e possui duas seqüências de leitura aberta (ORFs) que codificam a proteína *Gag* e a poliproteína *Pol* contendo domínios para protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase. Ainda foram encontrados duas regiões importantes, a PPT (Polipurina Trac) e *Chromatin Organization Modifer* que auxiliam na transcrição dos genes de transposição. Foi evidenciada por meio de análise estatística, a ocorrência de recombinação entre as cópias presentes no genoma de *C. heterostrophus*. A análise dos sítios alvo (5 pb) permitiu deduzir a introdução recente ou reativação de *Sophie* no genoma do fungo. Em contrapartida à possível expansão recente desse elemento, a comparação das seqüências que codificam a transcriptase reversa de *Sophie* sugere a presença do mecanismo de silenciamento RIP (Repeat-Induced Point Mutation). A expansão desse elemento (recente inserção ou reativação) ou o silenciamento por RIP pode representar um grande impacto na evolução do genoma de *C. heterostrophus*.

## 2. INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis são seqüências de DNA moderadamente repetitivas encontradas de forma dispersa no genoma hospedeiro. Estes elementos possuem a capacidade de se moverem de um local a outro do genoma (Hua-Van *et al.*, 2005) e suas inserções podem provocar um amplo espectro de mutações em seus hospedeiros (Kidwell & Lisch, 2000).

Existem duas classes principais de elementos transponíveis que se distinguem no mecanismo de transposição. Os elementos da Classe I sintetizam uma cópia de DNA a partir de um molde de RNA, via transcriptase reversa, e esta é então capaz de se inserir em um sítio alvo. Nos elementos da Classe II, ocorre diretamente um processo de excisão seguido de integração (Wicker *et al.*, 2007).

Os elementos da Classe I podem ser divididos de acordo com o mecanismo de transposição, organização e filogenia da transcriptase reversa em retrotransposon LTR, DIRS-Like, Penelope-like, LINEs e SINEs (Wicker *et al.*, 2007). Sendo que as duas principais superfamílias de retrotransposon são a *Gypsy* e *Copia* (Neumann *et al.*, 2003). O grupo *Gypsy/Ty3* é o principal grupo de elementos transponíveis encontrados em fungos fitopatogênicos (Dabousse & Cappy, 2003).

Transposons podem apresentar papel importante na evolução e adaptabilidade de genomas de fitopatógenos, pois podem permitir a perda ou ganho de virulência (Kang *et al.*, 2001). Entretanto, esses organismos possuem mecanismos eficientes de controle da alta atividade de elementos transponíveis, tais como RIP (Repeat-Induced Point Mutation) (Selker *et al.*, 1987).

RIP é um mecanismo de silenciamento gênico que eficientemente e irreversivelmente altera seqüências duplicadas de DNA no genoma de fungos. Originalmente encontrado em *Neurospora crassa*, RIP atua no ciclo sexual entre a fertilização e a cariogamia introduzindo mutações do tipo C:G para A:T. RIP tem sido encontrado em diferentes fungos como: *N. crassa* (Selker *et al.*, 2003), *Microbotryum violaceum* (Hood *et al.*, 2005), *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* (Braumann *et al.*, 2008) e *Colletotrichum cereale* (Crouch *et al.*, 2007).

O ascomiceto *Cochliobolus heterostrophus* é o principal fitopatógeno de milho e pode ser encontrado em áreas subtropicais e tropicais (Gafur *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos, este fungo geralmente é encontrado nos estados sulistas causando a doença denominada de “Southern Corn Leaf Blight” (SCLB) que levou a grandes

prejuízos na cultura do milho. Esse fungo é conhecido por produzir toxinas de baixo peso molecular que servem como fatores de virulência ou patogenicidade. O patógeno é um fungo necrotrófico modelo para análises clássicas e moleculares devido à fácil indução do ciclo sexual em laboratório e à eficiente integração homóloga, facilitando a mutagênese sítio-específica.

Existem duas raças conhecidas deste fungo, a raça O, mais antiga e menos destrutiva, e a raça T, responsável por grandes epidemias. Análises genéticas e bioquímicas demonstram que a alta virulência da raça T em relação a raça O deve-se à produção da toxina T (Tizeng *et al.*, 1992, Yang *et al.*, 1996). Kodama *et al.* (1999) detectaram dois locos (*Tox1A* e *Tox1B*) relacionados à produção da toxina T. Foi observado que esses locos estão associados à uma translocação envolvendo os cromossomos 6 e 12. Em 2008, realizou-se o seqüenciamento completo do genoma da linhagem C5, raça O, de *C. heterostrophus* e está em andamento o seqüenciamento da linhagem C4, raça T (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/>). A análise da seqüência translocada poderá evidenciar o envolvimento de elementos transponíveis na translocação, uma vez que tais elementos foram encontrados no loco *Tox2* de *Cochliobolus carbonum* (Panaccione *et al.*, 1996).

Os elementos transponíveis podem ter importante papel na estruturação do genoma de *C. heterostrophus*, permitindo um aumento na adaptação deste fitopatógeno a diferentes ambientes e dificultando o controle da doença. Nesse trabalho, caracterizou-se o retrotransposon *Sophie* de *C. heterostrophus*, que pertence ao grupo *Gypsy/Ty3*, e obtiveram-se fortes evidências de atuação do mecanismo de silenciamento RIP em cópias do gene da transcriptase reversa desse elemento transponível.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação, classificação e análise filogenética da proteína transcriptase reversa de *Sophie*

Foi realizada a busca no banco de seqüências do genoma de *C. heterostrophus* (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/>) via ferramenta Search usando a palavra chave “reverse transcriptase”. Para a identificação das principais regiões do retrotransposon foi utilizado o programa LTR-FINDER. A classificação do elemento foi realizada pelo banco de dados do programa GYPD database e pela análise filogenética da proteína transcriptase reversa de outros grupos de elementos obtidos no GenBank: *Maggy*, *Magnaporthe grisea* (AAA33420); *Real*, *Alternaria arternata* (BAA89272); *Ty3*, *Saccharomyces cerevisiae* (M23367); *copia*, *Drosophila simulans* (D10880); *Ty1*, *S. cerevisiae* (Z48149); *jockey*, *Drosophila melanogaster* (M22874); *Penelope*, *Drosophila virilis* (AAL14979) e *DIRS*, *Lytechinus variegatus* (BK001257). O alinhamento foi realizado utilizando o programa MEGA4 e para a análise de agrupamento foi utilizando o método UPGMA com valores de bootstrap de 5000 replicatas.

#### 3.2 Análise dos ácidos nucléicos e proteínas

As seqüências de proteínas do retrotransposon *Sophie* foram comparadas com seqüências depositadas no GenBANK utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na página do National Center for Biotechnology Information ( [WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). O alinhamento das seqüências foi realizado no programa MEGA4. As seqüências utilizadas nas análises de alinhamento são encontradas no GenBank com os respectivos números de acesso: *grh*, *M. grisea* (M77661, M77661); *marY1*, *Tricholoma matsutake* (BAA78624, BAA78625); *Ty16*, *Yarrowia lipolytica* (CAG34126, CAG34127); *skippy*, *Fusarium oxysporum* (AAA88790, AAA88791); *Cgret*, *Colletotrichum gloeosporioides* (AAG24791, AAG24792); *CfT1*, *Cladosporium fulvum* (AAF21677, S23570). Para busca de domínios conservados foi utilizado a plataforma do NCBI no campo de busca BLAST (conserved domains- CDS).

### 3.3 Evidências de RIP

Foram analisadas 37 seqüências de DNA de transcriptase reversa de *Sophie*. As seqüências de 532 pares de bases foram obtidas do banco genômico de *C. heterostrophus* ([www.jgi.doe.gov/genome-projects/](http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/)).

Para alinhamento das seqüências e composição estatística de nucleotídeos foi utilizado o programa MEGA4. Para a análise de dinucleotídeos e cálculo de índices para RIP foram utilizados o software RipCal (Hane & Oliver, 2008). Os índices utilizados para evidenciar RIP foram TpA/ApT e (CpA+TpG)/(ApC+GpT).

Fontes de índices para outros transposon: transposase de *Colletotrichum cereale* (Crouch *et al.*, 2007), *PeTra* de *Penicillium chrysogenum* (Braumann *et al.*, 2008), OPUIO3-1414 de *Ophiostoma umi* (Bouvet *et al.*, 2006), *Fot 1* de *Fusarium oxysporum* (Daboussi *et al.*, 1992) e *Punt* de *Neurospora crassa* (Magolin *et al.*, 1998).

## 4. RESULTADOS

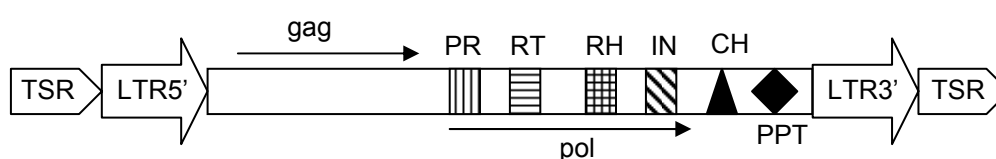
### 4.1 *Sophie*, um retrotransposon do grupo *Gypsy/Ty3*

Uma busca no banco genômico de *C. heterostrophus* utilizando como palavra chave “reverse transcriptase” permitiu a identificação de sete cópias intactas de um elemento transponível denominado *Sophie*. As seqüências de *Sophie* possuem 7.426 a 7.512 pb com identidade de 91% (Tabela 1). *Sophie 1* foi escolhido como retrotransposon modelo para as análises. Esse elemento apresenta longas repetições terminais (LTRs) diretas conservadas de 494 pb e duas ORFs (seqüências de leitura aberta), uma que codifica para a proteína *Gag*, e outra para a poliproteína *pol*, composta de protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase. As LTR 5' e 3' possuem 100% de identidade e alta similaridade com retrotransposons do grupo *Gypsy/Ty3* que tipicamente terminam em repetições invertidas com um consenso de 5'-TG...CA-3'.

**Tabela 1:** Cópias intactas do retrotransposon *Sophie* encontradas no genoma de *C. heterostrophus*.

Identificação	Scaffold	Tamanho (bp)	Tamanho LTR (bp)	Identidade LTR (%)
<b><i>Sophie 1</i></b>	22	7.469	494	100
<b><i>Sophie 2</i></b>	8	7.472	494	100
<b><i>Sophie 3</i></b>	24	7.426	485	100
<b><i>Sophie 4</i></b>	28	7.471	494	98,8
<b><i>Sophie 5</i></b>	2	7.472	494	99,8
<b><i>Sophie 6</i></b>	5A	7.512	495	86,5
<b><i>Sophie 7</i></b>	5B	7.483	508	100

Duas outras características estão relacionadas às regiões importantes do elemento transponível: a primeira é a presença de “Chromatin Organization Modifier” que está envolvida com a expressão gênica de vários genes; a segunda é a presença de uma região rica em purina com aproximadamente 11 a 15 pb denominada de PPT (Polypurine Tract). Essa região é importante para a transcrição reversa do elemento transponível (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Estrutura básica do retrotransposon *Sophie*. A região *pol* contém os domínios PR (protease), RT (transcriptase reversa), RH (RNase H) e IN (integrase). Duas outras regiões importantes para a transcrição a CH (Chromatin Organization Modifier) e a PPT (Polypurine Tract) estão representadas por triângulo e losango, respectivamente.

GCCTATGTTACAAGTAACAAGAAGGATTCTCTCCTTGACGCGGGATGACGAGGTTAAAGACCAACC  
 ACGTCCACGTGAGAAGGTAACGACCATCGCGGGGCTGGAGGTCACGTGATATGTGTGCTCCCGCCA  
 AGAGCCCTGCTCCCGGAGCACGGGGGCTTGGGAGAAATTATGCTCCACTGCTCCCAAAGAAAAG  
 GGAGAATAGGGAGCACCAGGACAGAAACAATGAGGATATAAGGATGGATGGATTTTCATTATTACTC  
 TC GTTGTGGTCAACTCAAATTTGACTTTTCTTACTAGTTACTTAACTTCACAAGATTGATACTTGT  
 AGTCTATTGATATAGATTAGGAATTGTCAACCTATTGTTACTTTCTATACAAGCACGCCACTCC  
 ACTGTATCGCCAGACAAAATACCTCACGGCGCTCTTCACACCATCTCACTCACCCTAACCCGGATCG  
 AGCTTAGAGAAGTATCAGCACCAAAACCCCGTGAACAATTTGACCACCCACGGATTTCAGTGGACTT  
 AGGAAGATTAACATTAGGACGCCCCGATTAAGACTTACGATGTCCTCACAAACCATTCTCAGTCACAGG  
 CTAGTGCCGGTGGACCAGTTCAAGGTCCCGACCGATGCTTAACCCAGCAATCGACGACGAGATGT  
 TGACTCCAGCGACGATGAGGAGGAGACAATGGATAACCCTAGGCAAATGGTTTCATAGTCTTAGGC  
 GACAGCCGAGATCCATGCACGGCAGATGGCCGAGATGCAAGCGATGATCAATCAGCTCACGAGTC  
 AGCTGATGGCCACACCAACGAAAAGCCTATCAAAAAACCCAAGATGGCAACCCCGACAAATACG  
 ATGGTAACCGAGAAGGGTTACGGACGTTCCCTCACCACTATCGAGTTATACTGCGGCTACAACGATG  
 TGCCAAACGATGCAGAGAAGATCCTTATGGCAAACACACACCTAAAAGGAAAAGCAGCCAGCTGGA  
 TGCAACCCCTACGTGGAGGATTTTCTATTGGACATCAACAACAAGGGAAC TAAGGACGAGACGCGTA  
 CCTTATTTCAGCAGTTGGGCCAACTTCAAGGAGGAAATGGGACGCATCTTTGGGGAGGTAGACGCGG  
 AAAGCCAGGCGGAGAAAGCGATACCTCGCTGAGGCAGACCAAAGCAGTTTCGGCCATACGGCGG  
 AGTTCAAGCAACTACAAGCGGAATCAATTGGGACGATTCGGCAC TCCGGACGGTATACGAAGCAG  
 GTCTGAAGAAAACATCAAGGACGAACTTGTACACTATGACAAGCCGAGGGACTTGTACTCGTTGA  
 TCGAGTTGGCAACAAGAATCGACACGCGATTATGGGAACGAAAGGAAGCCAGAAAGGATACAAGC  
 CAGGGCCACCCCTTTGCCAACACCCGAAGGTATCGGAGCAACAAGGATCACGACGGAGACACGTACA  
 TGACCGGCAAAGTACAAGACAAGTCTAAGGATAAGAACAAGACCCGAGGAAAGTTTAAACGACGGTC  
 ITTCCAAGGAAGAACGCCAGAAGCGTTACGACAGTAAGGCATGCCTCCGCTGCGGCGAAGTAGGAC  
 ACTTCCGTAGGGACTGCCCGAAGAATGAAGTCAAGCAAGGAGCGGTTAAGATCGGAATGCTACGGA  
 TGGCAACACCATAACCCGACTGAGGAACTAGACGAGACTCTCAGCGACCTAGACCTGTACGACGAAG  
 CAAGACAAGCCACCGATGAGGCCTTTGAGCTAGTACAGAAGGCGATAGGACTCCAAGACTTCAAGT  
 GGGACGAACCACTACCAACGGATTGGCAGGTTGAAGGGGCAGAGGTACTACGCCGCCTAAGAAACC  
 AACAGTGTGGATTTGTGAAATACCAGGCACCAAGCCAACGACTGCGATATCGAAGGACGAATCA  
 CAATCACGGGACCCCGAGCAGATGAGATTGCCTGCAGGGCTGCCAGGAACAACCCAGATTCAAGG  
 AATCTGATGACGAGGAGACGCTCGGACGTTCAAGGAACGAATGGAGCAACACGAGCGCCTACGTT  
 GGGTTGACTGCCCAAGACAGTGTGATTATCACCTTGAGGAAGCGAGAAGAAACCAGGAACAACGAGG  
 ACGATTGCTGCCATATCAACTTATGGCATAACGAGTGTGAGTACAGCATTGCCAGGTGCACCAGC  
 CAGGAGAAAAGGAAAGCTCACGAAGAGCTATGCTGGATCAATTGTACGACCAATTGCCAGTTCCACA  
 GGGAAACAACGACGGAATGCTCGAAAGGTAGACGACTACTACCATAGCACGATATCCGCCGAGGAAT  
 GCAATGCGAAGAAGTGCAGGATGCACAGAGCTGCAAGACCAAGAGTACGATGACTAGGGTACCTA  
 GGCAGGATCAGGGAAAAGTCCAACGAGGAAAAGAGCCACGAACGACTCTTATGGACGCATTGCAGGA  
 AGGGATGCGCCTTCCACCGACAACAGTTTGGAGGATGCTCGCGGAGTGAACGATTACCTCCATAGCA  
 CCTTGTGACGAAAACATCTGTGAGGCAGACGGATGCCCGATTACAGAACGAAGAAGCCGAGTCCAA  
 CGAGGAAGGTTGCGAAGGACGATATACCGCACCCGAATATCCATTGGAGCTTCTGTTACGACGATC  
 AGTGTACGATACACTATTCCGCCAAGGAAGGCGAAGGCTACTTTCCCTAAACAGAGGAAAGGTAAGC  
 AGACAAAAAACTAGGATGCGCCAGGGACAGGGTCAAGCTGGTGAAGGCAGTCTTAAACGACCCCT  
 CAAGGAAGTACGCGAACTGGGAGCGCAGGATTTGCGGCTGCAGGCTACGGTACTTATAGACGGACA  
 CGAGGTGACGGCGCTCATAGACAGTGGGGCCGCACGAACCGTTATCTCACCCCGAGTGGTGGAGAA  
 GAACAACATACCCTATCGGGCCAAGAAGGTGCCGATGCGAGTGGTATTAGCCGACGATAGTCCCAC

LTR5'

GAG

**Figura 2.** Seqüência do retrotransposon *Sophie 1* presente no banco de dados do projeto genoma de *C. heterostrophus*. O sítio alvo (TSR) está em itálico, as longas repetições terminais (LTRS) estão representadas em cinza, a região *gag* e a região *pol* estão representadas por caixas e os seus domínios sublinhados. As regiões PPT e “Chromatin Organization Modifer” estão em itálico e sublinhados no final da região *pol*.

GACATACGGGAACGGCTGGATTGACTTGGAGACCGAGGCAGTATCGTTACGCCTGGCTGGTCAAGA  
AAGCCGAACGAAGATTAGTATTATGGATCTCGGTGAGACCGAGATGATAAATTGGCTACGACTGGTT  
GTTAGAGTACAACCCTGCCATCGACTGGCAAAGAAATCGATACACAGCCGAGAACCCTGTGCACAA  
GGTTGCTGGTGTACGACGAGAAACACGCCCGACGGATCAACGCGCGCACCCAGATGGGAGATTCCG  
TGTGATTTCCGCCATAAGATCGCGAGAATCTATGCGAAGGACCCTCAGAGAGTAGGAGTCATCTG  
GATACGGCAGGTCGCGACCACGAAGGAAGGACCCTGACACAGGTTGCGTCCGTTCATGACGAACC  
ACTGCTGGCGGTTCCAGCAGAATACCGAACATCAGAGTTCAAGGAACGTTCGAGGAAAACGAAGC  
AACAGACTTAGCAGAACACCAGGATTGGGATCACGAGATCATCTTGGAGGAAGGAGCGAAGTTGAG  
CCCAGGAGGAATGTACCCTATAGCGCCCGAGCAGATGCTGAGCTGCGGGATTACCTCCAGAAGAA  
CTTGAAGAGGGATTTATCCGACCAGGATCAGGCCCGATGGCCCTCGCTATACTGTTCTGTAAGAA  
GCCTAACGGGAAGTGGCGACTATGTGTCGACTTCAAGGAGTTGAACAGCGTTACTCGGAAGAATCG  
ATATCCCTTACCCTGATTACAGAGCTCATGGATCGACTCCAAGGAGCTAAGTGGTTACGAAGTT  
CGACGTTCCGGGAAGGATTTTACC GAATCAGGATCAAAGAAGGTCACGAGTGGATGACGGCGTTTAA  
GACGAAGTATGGACTGTTGAGTATACGGTTATGCCATTCGGGTTGACGAATGCGCCGGCAACCTT  
TCAATCAGTCATCAACAACGCGCTCCACGAATACCTCGGAATCTTTGTTACCGCGTATCTGGACGA  
TGTACTAGTGTACTCCAGCGGCACACGCGAAGAATGTCGAGCATGTTAAGAAGGTTTTACGAAA  
GCTTAAGGAATACAAGCTATACCTTCAACCAGGAAAGTGTGAGTTTACACGCAGGAAAACCGAATT  
CCTCGGATTTATCATCTCAACC GAAGGAGTGA AAAATGAACCCAAAGAAGATACAGACTGTACAGGA  
ATGGCCAAAACCAACACAGTCAAGGATGTTCAATCCTTCTTAGGATTTGCGAACTATTATCGAAA  
GTTTCATCAAAGATTACTCGAAGATCACGGCACCCCTTACGGAGATAACGAAGAAGGAAATAGGTTT  
CAAATGGGAGCAGGAACATCAGGAGGCTTTTTGATCGAATCAAGCAGATATTCCTGGAGGCGCCGGT  
ACTAGAGATGTACAGCCCTCAGAGACCCACCAGAGTCGAGACCGACGCGTCTGACTATGCACCTCGG  
AGCTGTATTGTCACAGCAGTGCACGGATAAGAAATGGAGACCGGTGTTCTACCAATCACGGAAGTT  
CTCAGGAGCAGAACTCAATTACGACGTTACGATAAGGAACTACTTGGAGTAGTCGATGCCTTTGA  
ACAATGGGAGGTGTACCTGTTAGGACTCCCCGACACGATCGAGGTTTTTACCGATCACCAGAATCT  
GACGAGTTTCATGACAACGAAGAACTCAACC GCGCGGGAACGCTCAATGGAGCCGACAGCGCTTAA  
GTTGACTTTAAGATAACGCACCCGCGGGAACGCTCAATGGAGCCGACAGCGCTTAAAGTGAAG  
GTCTGATTTGCGCGAAGAGGGTCAATAAAGAACCACATGACGCCTTACTTAAGACGATGCCCGTAGG  
CAGTCTGAAGTACAACCAGCCGGAAC TAGCTAAGGTAGCTAAGGTGGCCGAGCAGGTAGAAAACGCT  
ACAGCAACAGTGGCAGCAGCGAGCAGCCAGCTGGCAGTTCGAGCCCGACGAAGCAGGCTCCGACGA  
ACTGTTGAACGACGAACGGGAGTACCGAGATATGGTTTTCGAAGGATCGAACATATGTACCTCCACA  
CATGAGATCGAGTCTCATAACAGGAAC TGCACGAGTCCACGGAATACGGACACGCAGGAATCGAAGA  
AATGGTTAGACGACTGTCTAAGGTGTTTGGGATACCACGTATGCGTACGAAGGTGCAGGAGATACT  
AGGCAACTGTTTGGCATGTACCAGAACAAAGCCAAAGAGACATAAGCCCTATGGCCTGTTACAACC  
CTTACAGCCGCCGTCTAGACCATGGACAAGTGTAAACGATGGACTTCATAGTGAAGCTCCCGAGATC  
GTTGGAACCAGGATCAGCTCGATTTTGGGACACAATCCTAGTAATCGTGGACCGATTGACTAAGGC  
GGCAAAGTTTGTGCTACGGAAGAGACTATTACGGCAGAAGAATGCGCGTACGAAGTCACCAAAGC  
ATTAGTGTACAGCATGGGATACCTGAAGAGTTCATCACCGATCGTGATAAACTGTTTACGTCTAA  
ATACTGGAATACATTCCTGGCGAAGTTAGGTGTCAAAAAGAAGCTTTCGACAAGCTTTCACCCGGA  
AACAGACGGCCGAGACGGAAACGAACAAACCAGACATTAGAACGTACTTACGGATGTACGCCAACAA  
ATTGACAGGACAACTGGGTAGAGTTGTTGCCGACAGCGCAATTGGCCCTACAACAGCAGGATCCAC  
AACGACGAAGCATTCGCCGCACTACGCGAACTACGGATATGAGCCGGTAGCTCATCGAGATCCGAA  
GGACATTTGAGAGTATCGCGGTAGGGGCAGACGACAAAGCGAAGCTTATGCGAGATTTGCACGAAGA  
ATTAAGCAAGAACCTAGCTCAACGGAACCTCAGACATCCAAGGCAGCGAATAAACAAAGGATTGA  
GGGACCAACCTTTAAGAAGGGGGACAAAAGTTTTCTTGTACGACAAAACCTGAAAACCTAACGACC  
ATGCAGGAAATGGACAACCTCCGAGTAGGACCATTTCGAGATCCTAGAGGAAATAGGAAAAGTAAA

pol

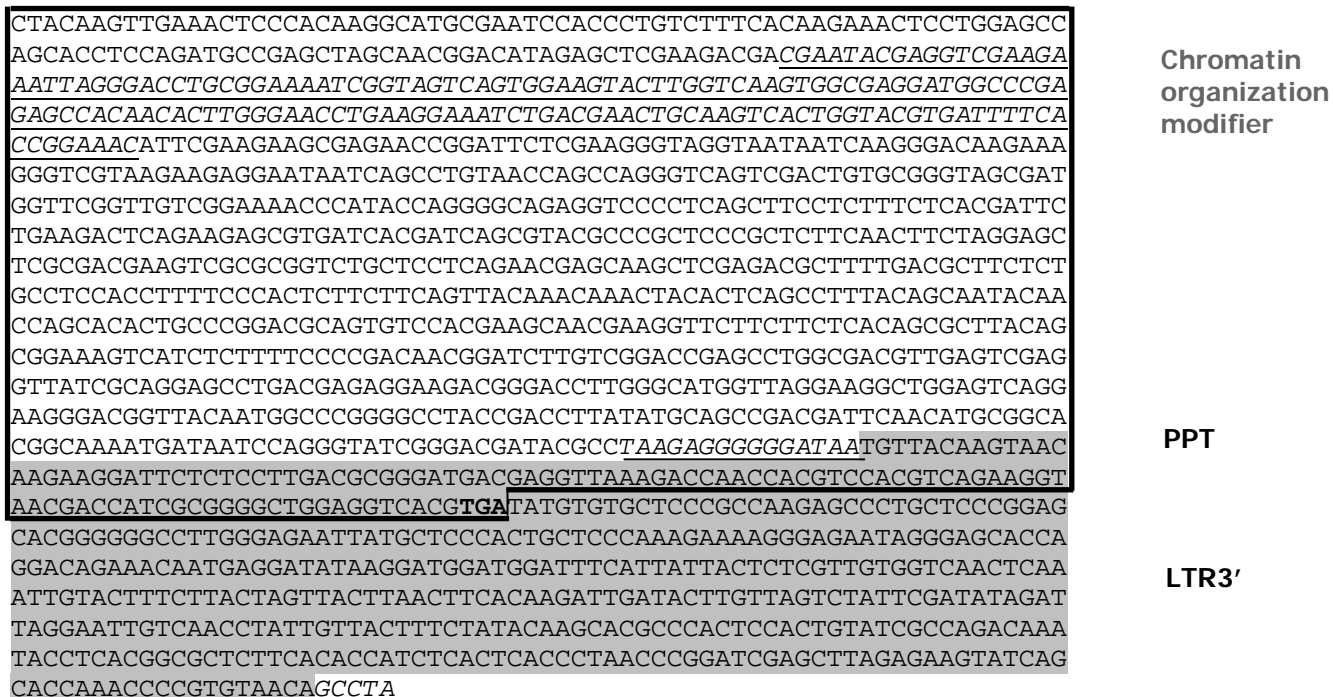
PR

RT

RH

IN

Figura 2: continuação



**Figura 2:** continuação

Além disso, existem sinais de inserção do elemento transponível denominado de TSR (Target Site Repeat) que são duplicados no momento da inserção. Dessa forma as TSR flanqueiam a LTR 5' e a LTR 3'. Geralmente as TSR possuem de 4 a 6 bp. No caso das diferentes seqüências de *Sophie*, os sítios de inserção foram diferentes, sendo que em alguns casos foram encontrados sítios de inserção diferentes flanqueando o mesmo elemento (Figura 3).

## Scaffold

8	<u>GCCTA</u> TGTTAC.....GTAACAG <u>GCCTA</u>
22	<u>GTTAG</u> TGTTAC.....GTAACAG <u>GTTAG</u>
2	<u>GCAACT</u> TGTTAC.....GTAACAG <u>GCAAC</u>
5B	<u>TAGTA</u> TGTTAC.....GTAACAT <u>TAGTA</u>
28	<u>GTTAG</u> TGTTAC.....GTAACAC <u>CTTAC</u>
5A	<u>CTAAT</u> TGTTAC.....GTAACAC <u>CTTCA</u>
24	<u>CTAAT</u> TGTTAC.....GTAACAT <u>TTAGT</u>

**Figura 3:** Alinhamento da seqüência de nucleotídeos dos sítios de inserção do elemento transponível *Sophie*. Em negrito e sublinhado estão a duplicação do sítio alvo, TSR. A seqüência completa do elemento transponível foi omitida, somente o início da LTR5 e o final da LTR3 estão representados.

Foi possível identificar as duas ORFs características de retroelemento do grupo *Gypsy/Ty3*. A primeira ORF diz respeito a região *gag* responsável pela síntese do envelope. Ela está localizada a 67 pb *downstream* da LTR 5' começando com um códon ATG e finalizando com o codon TAG após 2.720 pb. A análise comparativa do domínio desta proteína com a de outros elementos transponíveis permitiu a identificação de um domínio conservado, também presente em outros elementos transponíveis e retrovírus, relacionado a um domínio dedo de Zinco de ligação ao DNA (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-His-X<sub>4</sub>-Cys) (Figura 4).

A outra ORF presente no retrotransposon *Sophie* 1 começa com o códon ATG 2.580 pb *downstream* à LTR 5' e possui 4.014 pb com o códon de parada ATG sobrepondo a região LTR 3'. A região *pol* é composta por quatro domínios de atividade diferentes: protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase. A protease apresenta o motivo conservado DSG (Asp<sup>21</sup>, Ser<sup>22</sup>, Gly<sup>23</sup>), proposto ser o sítio ativo da enzima (Kato *et al.*, 1997) enquanto a transcriptase reversa apresenta os sete domínios descritos por Xiong & Eickbush (1990) e o motivo YXDD (Tyr<sup>365</sup>, Met<sup>366</sup>, Asp<sup>367</sup>, Asp<sup>368</sup>) no domínio cinco, proposto ser parte do sítio ativo desta enzima (Varmus & Brown, 1989). A integrase apresenta o motivo DD(35)E (Asp<sup>817</sup>, Asp<sup>859</sup>, Glu<sup>895</sup>), relatado ser altamente conservado entre integrases de retrotransposons (Khan *et al.*, 1991; Capy *et al.*, 1997).

## Região GAG – motivo dedo de zinco

```

CfT1      PSSRETRTCYGCCKPGHIARDCRGKNMVR
Ty16     YNQRTSRECYTCGKIGHLARDCHRHRERVQ
grh      QRRRETGAACLRGNSGHQVADCTYAAALR
Sophie   QKRYDSKACLRCGEVGHFRRDCPKNEVKQ
Mary1    SRARKLDLCYRCGEPGHRAGACPHRQDIR
Cgret    DNWKKDKQCFNCNQKGHLAYECPAPKKQQ
Skippy   D--KSKVTCYNCGKKGHYERECKNPKVKTN

```

\* \* \* \* \*

## Região pol – Domínio protease

```

Mary1    MTDTGQILS---VSALLDSGATG-LFIDSHLVQQHRLNTRSLSRPIPVYNVDGSPNE---
CfT1     VFRTKIIVNGHKTDAMIDSGASG-NFASESFVTRNRIATCCKKEGYELIAVDGSSLP---
Skippy   CLELKVRIKGKWLSALVDSGADM-NFISPTTVNELRLPWKDKNDPYTVHDGQGETYLYEN
Cgret    HLQLRVIINNQTALALIDSGSEG-DFVSPRAVNKLRIPWHEKRQPYQLNNVEGEQVQYEG
Sophie   RLQATVLIDGHEVTALIDSGAAR-TVISPRVVEKNNIPYRAKKVPMRVVLADDSPTTYGN
Ty16     PISIPYCYNGTTVQALLDCGASS-CFISRNLAEKLGLKMTPCK-PRQVQSVHSMETTN---
grh      FLIPALLDNSQFVNAQVDSGCECYAAMSDKCATRLRLIERIPLPQARHVGTAVGRAQP---

```

. . . \* : \* . \* . . . . . :

```

Mary1    AGAIREVADLVLRYKDHSERALFAVTQLGKQKAILGYPWLRDHNPEVDWRTGEVTMS
CfT1     -SVERETIPLPLAIQRHHEEITLDVTDMASHDIVLGMPWLRKHNNPVIDWRRGVLT--
Skippy   GNITREIDHLKVFVNGKNQGIDFDIIPVWRYDLVLGYPWLLRYNPQFNWRTGQVDCE
Cgret    GTIKNETAPLEMSYLDRNEQLQLDITNIGEYDLVLGMPWLEKNNPRIDWRTGQLHWD
Sophie   GWIRLETEAVSLRLAGQESRTKISIMDLGETEMIIGYDWLLEYNPAIDWQKKSIHSR
Ty16     ---YTVEVPVELGKWG-CDVFAYVLPQMVGQELLLGMPFFEEYHEAVDFKARTFTPD
grh      --MIRELAKCEMDVDGWVTPMLFYIVPGLARDVILGLPWMTHRRISLDAARKKLVVG

```

: : . : \* : : . . :

## Região pol – Domínio transcriptase reversa

```

Cgret     1 2
GYIRESTSPAGSPILFVVPKKNG-KLRLCVDYRMLNEMTIKNRYPLPLIDELQRLLLHGANW
Skippy    GYIRPSKSSAGFPVMFVPKPNSNKLRLVVDYRQLNEITEKDRTSLPLITELKDRLFGKW
CfT1     GWIRRSTSSAGTPCMFVPKANG-KLRLVQDYRKLNEITIKNRYPLPNIEEAQDRLTGSDW
grh      GWIRASSSSAAAPVLMVRKASG-GWRLCVDYRALNSITMQDRYPLPLIKETIRSLTGARW
Sophie   GFIRPGSGPMASPILFVVKPNG-KWRLCVDFRRLNSVTRKNRYPLPLITELMDRLQGAKW
Mary1    GRIRPSKSPMASPFFVVKKKGD-SLRPVQDYRRLNNITVKNRYPLPLISELVNQLHGARY
Ty16     GIIRPSKSPYSAPLVIVKKGG-ELRICTDYRALNELTTKDRFPLPRIDDILCLDGADT
* * * . . . . * . : * * . . * * * * * : * : * * * : * *

Cgret     3 4
FTALDLKGAYNLIRMEGEEWKTAFTRKGHFEYLVMPFGLTNAPATFQNMINQVLR-KF
Skippy    FTALDLKSAYNLIRIKEADEWKTAFRTKYGLFEYLVMPFGLTNAPAVFQRMITNVLR-EY
CfT1     YTKIDLRDAFYAIRMAEGEEWKTAFRTRYGLYEFLVMPMGLTNAPASCQDLVNETLR-DL
grh      FTKVDVRAAFHKLRIAEGDEHLTAFRTRFGLFEWLVCPFGLAGAPATFQRYVNGVLG-DT
Sophie   FTKFDVREGFYRIRIKEGHEWMTAFTKYGLFEYTVMPFGLTNAPATFQSVINNALH-EY
Mary1    FTKLDVVRWGYNNVRIKEGDEWKAAFFRTNRGLFELLVMPFGLTNSPATFQTMNDIFHDLI
Ty16     FSKFDLLSGYWQVLVKESDVHKTAFSTRSGHYEYLVMPFGLCNAPATFQRLMNDALR-PF
: : * : : : : * . . : * * * * * : * * * : * * * : : * :

Cgret     5 6 7
VDIFVVVYLDDILIFSP-TLKQHEVHLVLQALQNAKLLVEPEKSKFHAQEVEYLGFTI
Skippy    LDIFVVCYLDDILIFSD-TEEEHTEHVHKVLKALQDANMLVEPTKSHFHQSQVTYLGHEI
CfT1     LDVCVAYMDDILVYTKGSLQEHTKQVQDVFERLTKSGFKTAPEKCEFHKKEVKFLGFI
grh      LGDYASAYLDDILIIYSSGSKSDHWSKVTRVLDKLAAGLNLDDKSAFAVKEVKYLGFI
Sophie   LGIFVTAYLDDVLVYSSGTREEHVEHVKKVLRKLKEYKLYLQPGKCEFHTQETEFLGFII
Mary1    LEGVVCYLDDILIFTR-MVEEHRITRLVLERLRRYKLYLHQDKCEFERTKIEYLGLII
Ty16     LNKTVCVYLDDIIIVFSR-NREDHKRHVREVLDALRQKFYAKKSKCELFRKKMGFLGHVV
: : . * * * * : : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

**Figura 4.** Alinhamento dos domínios das proteínas *gag* e *pol* de *Sophie* 1 com domínio de outros retrotransposons. A presença de um ponto (.) representa aminoácidos com baixa similaridade; dois pontos (:) aminoácidos com alta similaridade e asterisco (\*) representa aminoácidos idênticos. Os motivos conservados de cada domínio estão sublinhados. Os números de 1 a 7 representam os sete domínios da transcriptase reversa (Xiong & Eickbush, 1990).

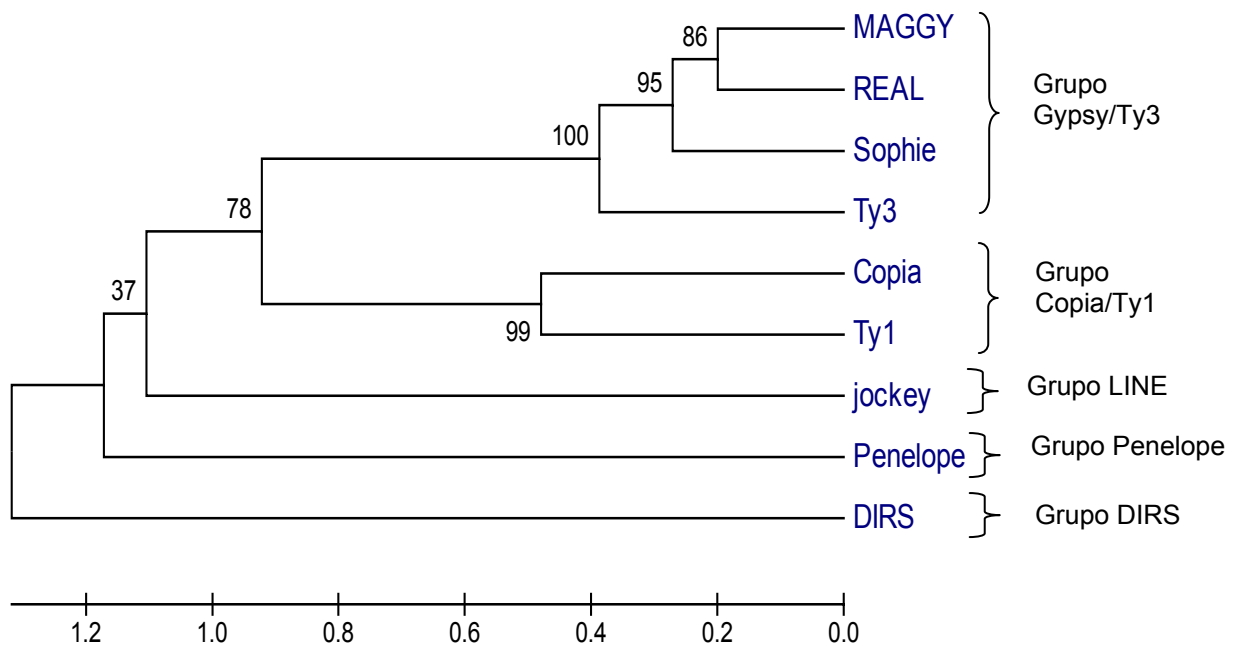


demonstrando mais uma vez que esta proteína está relacionada a outras transcriptases reversas do grupo *Gypsy/Ty3* (Figura 5).

**Tabela 2:** Análise de *Sophie 1* usando o programa GYPSY Database.

<b>Seqüência – retrotransposon</b>	<b>Score (bits)</b>	<b>E-Value</b>
<u>INT - <i>Cgret</i></u>	340	2e-94
<u>INT - <i>Cft-1</i></u>	322	3e-89
<u>INT - <i>Pyret</i></u>	322	4e-89
<u>INT - <i>Skippy</i></u>	313	2e-86
<u>RT - <i>Real</i></u>	276	2e-75
<u>RT - <i>Maggy</i></u>	273	2e-74
<u>RT - <i>Cft-1</i></u>	272	4e-74
<u>RT - <i>Cgret</i></u>	268	6e-73
<u>RT - <i>Skippy</i></u>	263	1e-71
<u>RT - <i>Dane-1</i></u>	263	2e-71
<u>RT - <i>MGLR3</i></u>	261	5e-71
<u>RT - <i>Galadriel</i></u>	255	4e-69
<u>RT - <i>Reina</i></u>	253	1e-68
<u>RT - <i>Beetle1</i></u>	248	8e-67
<u>RT - <i>marY1</i></u>	244	7e-66
<u>RT - <i>Peabody</i></u>	243	2e-65
<u>RT - <i>Legolas</i></u>	243	3e-65
<u>RT - <i>Retrosat-2</i></u>	241	7e-65
<u>RT - <i>Grasshopper</i></u>	240	1e-64
<u>RT - <i>CRM</i></u>	237	1e-63

INT significa integrase e RT transcriptase reversa



**Figura 5:** Agrupamento mostrando as relações entre o domínio da transcriptase reversa da região *pol* do retrotransposon *Sophie 1* de *C. heterostrophus* com outros transposons. Este agrupamento foi realizado pelo método UPGMA. Os números acima e abaixo de cada nó indicam a porcentagem de vezes em que cada ramo apareceu em análise de bootstrap com 5.000 replicatas.

#### 4.2 RIP (Repeat-Induced Point Mutation) em seqüências de transcriptase reversa de *Sophie* presentes em *C. heterostrophus*

Foram analisadas 37 seqüências do gene da transcriptase reversa de *Sophie*. A seqüência da transcriptase reversa de *Sophie 1* foi utilizada como referência nas análises. Os principais desvios do consenso da transcriptase reversa de *Sophie 1* foram mutações tipo transições de C para T e G para A, consistente com atividade de um processo semelhante a RIP. O número de mutações do tipo transição foi maior do que o número de transversões, sendo que a taxa de transição/transversão foi de 8,0. A porcentagem de A+T foi de 52,4%. Altos conteúdos A+T são esperados em fungos que sofreram o mecanismo de silenciamento RIP.

Foi contado o número de ocorrências das sete possibilidades de dinucleotídeos (CpA, TpG, CpC, GpG, CpG, CpT, ApG) que poderiam ser alvos de

RIP. As mutações ocorreram com mais freqüências em dinucleotídeos CpA e CpG (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sítios de dinucleotídeos preferencialmente mutados em eventos de mutação semelhantes a RIP.

<b>Razão de mutações observadas sítio a sítio em RIP mutações</b>						
CpA	TpG	CpC	GpG	CpG	CpT	ApG
<b>0,21</b>	0,05	0,10	0,11	<b>0,38</b>	0,06	0,09

Dessa forma, existe um forte indício de que os dinucleotídeos CpG e CpA são alvos para a mutação gerada por atividade de um mecanismo semelhante a RIP. Os índices,  $TpA/ApT$  e  $(CpA+TpG)/(ApC+GpT)$ , encontrados na literatura para evidenciar RIP obtiveram resultados condizentes com tal mecanismo de mutação. O rDNA de *C. heterostrophus* serviu como controle negativo por que estas seqüências não são alvos de RIP (Tabela 4).

**Tabela 4:** Índices Tpa/ApT e CpA+TpG/ApC+GpT para transposons e retrotransposons de eucariotos.

<b>Seqüências</b>	<b>TpA/ApT</b>	<b>CpA+TpG/ApC+GpT</b>
<b>Transcriptase reversa (<i>C. heterostrophus</i>)</b>	0,91	0,80
<b>rDNA (<i>C. heterostrophus</i>)</b>	0,64	1,36
<b>Transposase (<i>Colletotrichum cereale</i>)</b>	2,00	0,44
<b><i>PetTra</i> (<i>Penicillium chrysogenum</i>)</b>	1,22	0,58
<b><i>OPHIO3-1414</i> (<i>Ophiostoma ulmi</i>)</b>	1,51	0,60
<b><i>Fot1</i> (<i>Fusarium oxysporum</i>)</b>	1,12	0,75
<b><i>Punt</i> (<i>Neurospora crassa</i>)</b>	1,32	0,56

Valores de referência padrão de índices para RIP são TpA/ApT > 0,89, CpA+TpG/ApC+GpT <1,03; ([www.sourceforge.net/projects/ripcal](http://www.sourceforge.net/projects/ripcal)).

## 5. DISCUSSÃO

A análise de agrupamento da transcriptase reversa, a busca por similaridade no banco GYPD e a organização da região *pol* indicam que *Sophie* é um retrotransposon do grupo *Gypsy/Ty3* presente no genoma de *C. heterostrophus*. Foram analisadas sete cópias intactas do elemento, entretanto existem no genoma várias partes do elemento recombinadas. Além disso, a hibridização utilizando o gene da transcriptase reversa desse elemento em fungos correlacionados com *Cochliobolus* revelou que esse elemento está amplamente distribuído no genoma de vários fungos e que, dessa forma, é elemento antigo nesses genomas.

O retrotransposon *Sophie* é um elemento que foi recentemente inserido ou reativado no genoma de *C. heterostrophus*, pois dos sete retroelementos intactos encontrados no genoma seqüenciado na maioria deles as LTRs 5' e 3' foram idênticas e os sítios de inserção foram muito variáveis. Essas são características de elementos transponíveis com recentemente atividade no genoma. A alta similaridade das LTRs é indicativa de recente inserção visto que no momento da inserção as LTRs são idênticas e vão se diferenciando conforme o acúmulo de mutações. A maioria dos elementos transponíveis ao se inserirem em novo local do genoma duplicam seu sítio alvo (Chalvet *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2007). O fato de *Sophie* possuir vários sítios de inserção pode ser forte indício de atividade recente de transposição, pois é esperado que por seleção purificadora e deriva genética seja fixado um ou poucos sítios de inserção para diminuir os efeitos deletérios das inserções causadas por eventos de transposição (Neafsey *et al.*, 2004). Dessa forma, devido à possível atividade recente desse elemento, ele pode contribuir para o melhor conhecimento e organização genômica de *C. heterotrophus*, além de promover rearranjos (deleção, duplicação, inversão ou translocação) ou quebras cromossômicas devido à recombinação.

O fato de ter sido encontrado no genoma diferentes sítios de inserção nas extremidades de um mesmo elemento transponível pode ser devido a recombinação desse retrotransposon ou de um possível erro de montagem dos scaffolds. *Sophie* parece ser um elemento que sofre constantes recombinações e dessa forma pode contribuir para a reestruturação do genoma de *C. heterostrophus*.

Este estudo tem provido a primeira evidência de uma defesa do genoma contra elementos transponíveis em *C. heterostrophus*. Existe alta correlação entre os

nossos resultados e os encontrados na literatura para evidenciar RIP como: alta relação transição/transversão, forte preferência de sítios para mutações CpA e CpG, como encontrado por Montiel *et al.* (2006) para *Aspergillus oryzae*, e índices TpA/ApT > 0,89 e CpA+TpG/ApC+GpT <1,03. Além disso, foi encontrada alta similaridade em relação à proteína RID responsável por metilar seqüências de DNA alvos de RIP em *Neurospora crassa* (dados não publicados). A presença de transições CpA - TpA pode introduzir aumento de códons de terminação TAA e TAG e dessa forma silenciar genes (Montiel *et al.*, 2006). As mutações causadas por RIP em seqüências duplicadas podem levar à formação de novos alelos com diferentes funções (Galagan & Selker, 2004).

RIP ocorre durante o ciclo sexual entre a fertilização e a fusão nuclear (Galagan & Selker, 2004). Entretanto, *C. heterostrophus* não possui o ciclo sexual detectado na natureza, somente em laboratório é possível a indução da reprodução sexuada. Isso explicaria o fato de encontrarmos seqüências de LTRs de *Sophie* intactas no genoma de *C. heterostrophus*, pois sendo o ciclo sexual raro na natureza, RIP, que é um processo dependente deste ciclo, também deve ser raro.

O fato de *Sophie* possuir baixa especificidade no seu sítio alvo demonstra que este elemento possui recente atividade no genoma e pode ter importante papel na geração de variabilidade do fungo. Além disso, por possuir baixa especificidade no sítio alvo este transposon pode ser usado para mutagênese, ou ainda, como marcador molecular para estudo populacional e de diversidade genética.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAUMANN, I., BERG, M., KLEMPKEN, F. 2008. Repeat induced point mutation in two assexual fungi, *Aspegillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **Current Genetics** 53:287-297.
- BOUVET, F. B., JACOBI, V., PLOURDE, K. V., BERNIER, L. 2008. Stress-induced mobility of *OPHO1* and *OPHO2*, DNA transposons of the Dutch elm disease fungi. **Fungal Genetics and Biology** 45:565-578.
- CAPY, P., LANGIN, T., HIGUET, D., MAURER, P., BAZIN, C. 1997. Do the integrases of LTR-retrotransposons and classe II element transposases have a common ancestor? **Genetica** 100:63-72.
- CHALVET, F., GRIMALDI, C., KAPER, F., LANGIN, T., DABOUSSI, M. J. 2003. Hop, an active Mutator-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Biology and Evolution** 20:1362-1375.
- CROUCH, J. A., GLASHEEN, B. M., GIUNTA, M. A., CLARKE, B. B., HILLMAN, B. I. 2008. 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** 45:190-206.
- DABOUSSI, M.J., LANGIN,T., BRYGOO,Y. 1992. Fot1, a new family of fungal transposable elements. **Molecular and General Genetics** 232 (1):2-16 .
- DABOUSSI, M. J. & CAPY, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology** 57: 275-299.
- GAFUR , A., TANAKA, C., SHIMIZU, K., OUCHI, S., TSUDA, M. 1998. Molecular analyses and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus*  $\beta$ -tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. **The Journal of General and Applied Microbiology** 44:217-223.

- GALAGAN, J. E., SELKER E. U. 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics** 20:417-423.
- HANE, J., K. & OLIVER, R. P. 2008. RIPCAI: a tool for alignment-based analyses of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. **BMC Bioinformatics** 9:478, doi:10.1186/1471-2105-9-478.
- HUAN-VAN, A., ROUZIC, A. L. MAISONHAUTE, C., CAPY, P. 2005. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research** 110: 426-440.
- HOOD, M. E., KATAWCZIK, M., GIRAUD, T. 2005. Repeat-induced point mutation and the population structure of transposable elements in *Microbotryum violaceum*. **Genetics** 170:1081-1089.
- KANG, S. LEBRUN, M. H., FARRALL, L., VALENT, B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **The American Phytopathology Society** 14: 671-674.
- KATOH, I. T., YASUNGA, T., IKAWA, Y., YOSHINAGA, Y. 1997. Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor. **Nature** 329: 654-656.
- KHAN, E., MACK, J. P. G., KATF, R. A., KULKOSKY, J., SKALKA, A. M. 1991. Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of the LTR sequences. **Nucleic Acids Research** 19:851-860.
- KIDWELL, M. G. & LISCH, D. R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution** 15:95-99.

- KODAMA, M., ROSE, M. R., YANG, G., YUN, S. H., YODER, O. C. TURGEON, B. G. 1999. The translocation-associated *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. **Genetics** 151: 585-596.
- LIORENS, C., FUTAMI, R., BEZEMER, D., MOYA, A. 2008. The Gypsy database of mobile genetic elements. **Nucleic Acids Research** 36:38-46.
- MAGOLIN, B. S. GARRETT-ENGELE, P. W., STEVENS, J. N., FRITZ, D. Y., GARRETT-ENGELE, C., METZENBERG, R. L., SELKER, E. U. 1998. A methylated *Neurospora* 5S rRNA pseudogene contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation. **Genetics** 149:1787-1797.
- MONTIEL, M. D., LEE, H. A., ARCHER, D. B. 2006. Evidence of RIP (repeat-induced point mutation) in transposase sequences of *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology** 43(6):439-445.
- NAKAYASHIKI, H., IKEDA, K., HASHIMOTO, Y., TOAS, Y., MAYAMA, S. 2001. Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY. **Nucleic Acids Research** 24:428-1432.
- NEAFSEY, D. E., BLUMENSTIEL, J. P., HARTL, D. L. 2004. Different regulatory mechanisms underline similar transposable element profiles in pufferfish and fruitflies. **Molecular Biology and Evolution** 21:2310-2318.
- NEUMANN, P., PAZARKOVA, D., MACAS, J. 2003. Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. **Plant Molecular Biology** 3: 399-410.
- NOVIKOVA, O. S., FET, V., VLINOV, A. G. 2007. Homology-dependent inactivation of LTR retrotransposons in *Aspergillus fumigatus* and *A. nidulans* genome. **Molecular Biology** 41:886-893.

- PANACCIONE, D. G., PITKIN, J. W., WALTON, J. D., ANNIS, S. L. 1996. Transposon-like sequences at the *TOX2* locus of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. **Gene** 176:103-109.
- RAY, D. A., PAGAN, H. J. T., THOMPSON, M. L., STEVENS, R. D. 2007. Bats with hATs: evidence for recent DNA transposon activity in Genus *Myotis*. **Molecular Biology and Evolution** 24:632-639.
- SELKER, E. U., CAMBARERI, E. B., JENSEN, B. C., HAACK, K. R. 1987. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell** 51:741-752.
- SELKER, E. U. TOUNTAS, N. A., CROSS, S. H., MARGOLIN, B. S., MURPHY, J. G., BIRD, A. P., FREITAG, M. 2003. The methylate component of the *Neurospora crassa* genome. **Nature** 422: 893-897.
- TZENG, T., LYNGHOLM, L. K., FORD, C. F., BRONSON, C. R. 1992. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics** 130:81-86.
- VARMUS, H., BROWN, P. 1989. Retroviruses. In Berg DE, Howe MM (Eds) Mobile DNA. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, 53-108.
- YANG, G., ROSE, M. S., TURGEON, B. G., YODER, O. C. 1996. A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. **The Plant Cell** 8:2139-2150.
- WICKER, T., SABOT, F., HUAN-VAN, A., BENNETZEN, J. L., CAPY, P., CHALHOUB, B., FLAVELL, A., LEROY, P., MORGANTE, M., PANAUD, O., PAUX, E., SANMIGUEL, P., SCHULMAN, A. K. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable. **Nature Reviews** 8:973-982.

XIONG, Y., EICKBUSH, T. H. 1990. Origin and evolution of retroelement based upon their reverse transcriptase sequences. **The EMBO Journal** 9:3353-3362.

## CONCLUSÕES

As técnicas IRAP e REMAP podem gerar numerosas marcas polimórficas para o uso em estudos de variabilidade genética em *M. pernicioso*.

Foram identificadas claramente duas populações no estado da Bahia, sugerindo duas introduções de *M. pernicioso* neste estado.

As populações de *M. pernicioso* se encontram estruturada em relação a biótipo e origem geográfica.

No genoma de *C. heterostrophus* foram encontradas sete cópias de um retrotransposon do grupo *Gypsy/Ty3* denominado de *Sophie*.

Possivelmente, *Sophie* é um retrotransposon com atividade no genoma de *C. heterostrophus*, podendo contribuir para geração de variabilidade genética nesse patógeno.

Houve evidência de recombinação deste elemento no genoma de *C. heterostrophus*.

Existe indício do mecanismo de silenciamento RIP no genoma de *C. heterostrophus*.