

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Transposição heteróloga de Impala em *Colletotrichum lindemuthianum* e
Colletotrichum truncatum, agentes causais da antracnose no feijão-comum e
na soja**

Bruna Caetano de Freitas
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

BRUNA CAETANO DE FREITAS

Transposição heteróloga de Impala em *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, agentes causais da antracnose no feijão-comum e na soja

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*.

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientador: Mateus Ferreira Santana

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F866t
2025
Freitas, Bruna Caetano de, 2000-
Transposição heteróloga de Impala em *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, agentes causais da antracnose no feijão-comum e na soja / Bruna Caetano de Freitas. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.658>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Colletotrichum*. 2. Translocação (Genética). 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Antracnose - Aspectos genéticos. 5. Marcadores genéticos. I. Queiroz, Marisa Viera de, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.567165

BRUNA CAETANO DE FREITAS

Transposição heteróloga de Impala em *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, agentes causais da antracnose no feijão-comum e na soja

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

APROVADA: 16 de abril de 2025.

Assentimento:

Bruna Caetano de Freitas
Autora

Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 15/10/2025 às 10:24:05 e pela orientadora em 15/10/2025 às 14:52:46. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **C4YI.375M.7VY7** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu querido Deus por ter me sustentado até aqui.

Aos meus pais, Rita e Roberto, que acreditam que eu posso tudo, por isso me apoiam e abraçam as minhas escolhas, mesmo sem entender muito bem o que eu tanto faço nesse tal de laboratório.

Ao meu irmão Douglas, por sempre me lembrar que preciso ser menos preocupada com as coisas, porque eu vou ficar velha cedo se continuar assim...

Aos meus tios, à minha avó Maria e meu avô José (in memoriam) por fazerem a Bruna criança acreditar que ela é capaz de muita coisa se pegar firme nos estudos. À minha amiga de infância e da vida, Thaís, por me mostrar que a jornada pode ser muito mais tranquila quando a gente tem com quem contar.

Agradeço ao meu querido Prin: Thiago, Millena, Thamires e Izabela, minha família de Viçosa, por me fazerem sentir em casa desde a primeira semana da graduação. À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, sou grata pela oportunidade.

À minha orientadora, Professora Marisa Vieira de Queiroz, pelo apoio, orientação e confiança. Sou grata por ter sido apresentada aos elementos transponíveis pela primeira vez sob a sua orientação. Trabalhar com eles foi um dos melhores desafios que aceitei até hoje.

Aos membros da banca, professor Mateus Ferreira Santana e professora Claudia Barros Monteiro-Vitorello, expresse minha gratidão por dedicarem seu tempo para avaliar e contribuir com o meu trabalho.

A todos do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, em especial a Patrícia, pela disponibilidade sempre que precisei. Aos amigos de outros laboratórios e também aos que fiz durante as disciplinas, que tornaram o meu processo de formação muito mais leve.

Agradeço as agências de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

E a todos que de alguma forma fizeram parte disso: o meu muito obrigada!

*“If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off... no matter what they say.”
(Barbara McClintock)*

RESUMO

FREITAS, Bruna Caetano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2025. **Transposição heteróloga de *Impala* em *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum*, agentes causais da antracnose no feijão-comum e na soja.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientador: Mateus Ferreira Santana.

O gênero *Colletotrichum* é amplamente reconhecido por sua relevância econômica e científica, por abranger muitas espécies de fitopatógenos e porque o seu estilo de vida hemibiotrófico é objeto de estudo para o entendimento da interação planta-patógeno. *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum truncatum* são os agentes causais da antracnose no feijão-comum e na soja, respectivamente, causando grandes perdas de rendimento nessas culturas em condições ideais. Muitas abordagens genéticas já foram aplicadas para entender os mecanismos de patogênese dessas espécies, mas ainda não há trabalhos que explorem a aplicação de elementos transponíveis como ferramenta molecular para estudos de genética funcional nesses fungos. Portanto, este estudo teve como objetivo testar a transposição heteróloga de *Impala*, um transposon isolado de *Fusarium oxysporum*, da Classe II, da superfamília *Tc1/Mariner*, em ambas as espécies, visando ao desenvolvimento de um sistema de mutagênese insercional aleatória. Para isso, mutantes defectivos para a enzima nitrato redutase foram utilizados como linhagens receptoras do plasmídeo pNIL160, que contém o gene *niaD* de *Aspergillus nidulans* interrompido por *Impala* na sua região promotora. Foram isoladas três linhagens de *C. lindemuthianum* contendo pNIL160 e duas linhagens de *C. truncatum*. Os eventos de transposição foram observados em ensaios de reversão da mutação *niaD::Impala* pelo surgimento de colônias *NiaD*⁺ capazes de metabolizar o nitrato. Foram obtidos 11 revertentes derivados da linhagem T26 de *C. lindemuthianum* e 43 e 1124 revertentes derivados das linhagens T2 e T3 de *C. truncatum*, respectivamente. A análise molecular dos eventos de excisão e reinserção, feita por meio de PCR e Southern Blot, mostrou que os eventos de transposição dos revertentes analisados foram independentes em ambas as espécies. A linhagem T26 de *C. lindemuthianum* apresentou uma taxa de transposição de 0,74/10⁶ conídios, enquanto as linhagens T2 e T3, derivadas de *C. truncatum*, apresentaram uma taxa de transposição de 2,9/10⁶ conídios e 74,9/10⁶ conídios, respectivamente. *Impala* reinseriu em um novo local no genoma de 71% dos revertentes analisados derivados da linhagem T26 de *C. lindemuthianum*. Já em *C. truncatum*, houve reinserção do elemento em 43% dos revertentes analisados derivados da linhagem T3. Esses resultados mostram que *Impala* é ativo nos genomas

de ambas as espécies e tanto a taxa de transposição quanto a frequência de reinserção observadas indicam que esse elemento tem potencial para ser usado para mutagênese insercional nesses fungos. Uma biblioteca de 300 candidatos a mutantes insercionais de *C. truncatum* foi criada. Para validar o potencial de *Impala* na marcação de genes envolvidos na patogenicidade, é fundamental que os revertentes obtidos sejam triados quanto a alterações na virulência. Além disso, em *C. lindemuthianum*, otimizações que visem o aumento da taxa de transposição de *Impala* poderão ampliar a sua aplicabilidade como ferramenta molecular de mutagênese.

Palavras-chave: transposon; mutagênese insercional aleatória; patogenicidade

ABSTRACT

FREITAS, Bruna Caetano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2025. **Heterologous transposition of *Impala* in *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum truncatum*, causal agents of anthracnose in common bean and soybean.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-adviser: Mateus Ferreira Santana.

The *Colletotrichum* genus is widely recognized for its economic and scientific relevance, as it includes numerous species of phytopathogens and because its hemibiotrophic lifestyle is a subject of study for understanding plant-pathogen interactions. *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum truncatum* are the causal agents of anthracnose in common bean and soybean, respectively, causing significant yield losses under favorable conditions. Several genetic approaches have been applied to understand the pathogenicity mechanisms of these species, but no studies have yet explored the use of transposable elements as a molecular tool for functional genetics in these fungi. Therefore, this study aimed to test the heterologous transposition of *Impala*, a Class II transposon from the *Tc1/Mariner* superfamily originally isolated from *Fusarium oxysporum*, in both species, with the goal of developing a random insertional mutagenesis system. To this end, nitrate reductase-defective mutants were used as recipient strains for plasmid pNIL160, which contains the *niaD* gene from *Aspergillus nidulans* interrupted by *Impala* in its promoter region. Three *C. lindemuthianum* strains and two *C. truncatum* strains containing pNIL160 were isolated. Transposition events were observed in reversion assays of the *niaD::Impala* mutation by the emergence of *NiaD*⁺ colonies capable of nitrate metabolism. Eleven revertants were obtained from *C. lindemuthianum* strain T26, and 43 and 1124 revertants were obtained from *C. truncatum* strains T2 and T3, respectively. Molecular analysis of excision and reinsertion events using PCR and Southern Blot showed that the transposition events of the analyzed revertants were independent in both species. The T26 strain of *C. lindemuthianum* showed a transposition rate of 0.74/10⁶ conidia, while *C. truncatum* strains T2 and T3 showed transposition rates of 2.9/10⁶ and 74.9/10⁶ conidia, respectively. *Impala* reinserted into a new genomic location in 71% of the analyzed revertants derived from the T26 strain of *C. lindemuthianum*. In *C. truncatum*, reinsertion of the element occurred in 43% of the analyzed revertants derived from the T3 strain. These results demonstrate that *Impala* is active in the genomes of both species, and both the transposition rate and reinsertion frequency observed indicate that this element has potential for use in insertional mutagenesis in these fungi. A library of 300 candidate

insertional mutants of *C. truncatum* was created. To validate *Impala's* potential for tagging genes involved in pathogenicity, it is essential that the obtained revertants be screened for virulence alterations. Furthermore, in *C. lindemuthianum*, optimizations aimed at increasing *Impala's* transposition rate could expand its applicability as a molecular tool for mutagenesis.

Keywords: transposon; random insertional mutagenesis; pathogenicity

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO 1	22
Transposição do elemento <i>Impala</i> em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>, agente causal da antracnose no feijão-comum	22
RESUMO	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 Microrganismos e condições de cultivo	27
2.2 Plasmídeos	27
2.3 Co-transformação genética.....	28
2.4 Isolamento de colônias revertentes.....	28
2.5 Caracterização molecular dos cotransformantes e dos revertentes	29
2.6 Tratamentos de estresse	29
3. RESULTADOS.....	30
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÃO	36
6. REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2	42
Transposição do elemento <i>Impala</i> em <i>Colletotrichum truncatum</i>, agente causal da antracnose em soja.....	42
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Microrganismos e condições de cultivo	46
2.2 Obtenção de mutantes Nit1⁻ resistentes ao clorato.....	47

2.3	Caracterização molecular dos mutantes Nit1 ⁻	47
2.4	Plasmídeos.....	48
2.5	Co-transformação genética.....	48
2.6	Isolamento de colônias revertentes.....	49
2.7	Caracterização molecular dos co-transformantes.....	49
2.8	Caracterização molecular das linhagens reveretentes.....	50
2.9	Análise de sequências.....	50
3.	RESULTADOS.....	50
3.1	Isolamento e caracterização de um mutante <i>nit1</i> estável.....	50
3.2	<i>Impala</i> é capaz de transpor no genoma de <i>C. truncatum</i>	52
4.	DISCUSSÃO.....	57
5.	CONCLUSÃO.....	59
6.	REFERÊNCIAS.....	60
	CONCLUSÕES GERAIS.....	64
	APÊNDICE.....	66

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Colletotrichum* foi introduzido por Corda, em 1831, com *Colletotrichum lineola* como espécie-tipo, isolado de uma *Apiaceae* na Europa Central (Corda, 1831; Hyde et al., 2020). Trata-se de um gênero cosmopolita que abrange um grande número de espécies, incluindo sapróbios, patógenos de plantas e insetos, patógenos humanos oportunistas, endófitos de plantas, promotores de crescimento e importantes produtores de metabólitos secundários (Marcelino et al., 2009; Shivaprakash et al., 2011; Gonzaga et al., 2015; Moraga et al., 2019; Talhinhos e Barroncelli, 2021; Silva et al., 2022). Entretanto, *Colletotrichum* spp. é conhecido principalmente por abranger muitas espécies fitopatogênicas, que são o principal foco de estudo do gênero, uma vez que causam grandes perdas econômicas em diversas culturas de interesse agrônomo ao redor do mundo. Essas espécies são associadas principalmente a ocorrência da antracnose em plantas ornamentais, frutas, gramíneas, cereais e vegetais (Udayanga et al., 2013; Talhinhos e Barroncelli, 2021).

Colletotrichum spp. são patógenos importantes tanto na pré-colheita, quanto na pós-colheita (Cai et al., 2011) e a grande variabilidade genética apresentada por essas espécies dificultam o manejo da doença no campo (Silva et al., 2011; Lima et al., 2013; Schena et al., 2014; Talhinhos et al., 2015; Lopes et al., 2024). Em sua maioria, os fitopatógenos do gênero apresentam um estilo de vida hemibiotrófico, em que a infecção se inicia com uma breve fase biotrófica, na qual o patógeno suprime a resposta imunológica do hospedeiro e se estabelece sem causar sintomas. Na sequência, o fungo passa para um estágio de necrotrofia, onde são secretadas enzimas que maceram o tecido vegetal, levando ao aparecimento de lesões necróticas, um dos principais sintomas da doença (O'Connell et al., 2012). Devido ao estilo de vida hemibiotrófico e a facilidade de manipulação em laboratório, espécies do gênero *Colletotrichum* têm sido usadas como organismos modelo para o estudo da base genética e molecular da patogenicidade (Perfect et al., 1999; Barroncelli et al., 2017). Assim, a relevância econômica e científica do gênero o colocou entre os 10 principais patógenos fúngicos em patologia molecular de plantas (Dean et al., 2012). Recentemente, *Colletotrichum* spp. também foi listado entre os 100 gêneros de fungos mais citados na literatura (Bhunjun et al., 2024).

Desde que o gênero foi descrito, a comunidade científica se dedica a entender e elucidar os processos biológicos que regulam o estilo de vida hemibiotrófico, bem como os genes que influenciam a patogenicidade. Geralmente, esses estudos focam na análise de mutantes com perda de função. Esses mutantes podem ser obtidos a partir de abordagens genéticas diretas,

que geram um conjunto de mutantes que serão triados quanto a um fenótipo de interesse, ou por abordagens genéticas reversas, que visam a inativação de um gene específico e avaliam o fenótipo resultante (Lyon et al., 2024). Uma ampla gama de estratégias foi empregada visando ambas as abordagens, incluindo Split-Marker (Cnossen-Fassoni et al., 2013), Integração Mediada por Enzimas de Restrição (REMI) (Thon et al., 2000), transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Nabi et al., 2022) e sistemas baseados em CRISPR/Cas9 (Zhang et al., 2023). Elementos transponíveis também são usados como ferramenta molecular em estudos de genômica funcional há décadas e, curiosamente, o potencial desses elementos como ferramentas moleculares em abordagens genéticas diretas permanece pouco explorado no gênero *Colletotrichum*.

Elementos transponíveis são sequências de DNA capazes de mudar de lugar no genoma. Desde que foram descobertos pela geneticista Barbara McClintock (McClintock, 1950), os elementos transponíveis, ou transposons, têm sido reconhecidos por seu protagonismo na interação planta-patógeno (Moller e Stukenbrock, 2017). Eles são importantes geradores de variabilidade genética, sendo capazes de mutar genes, influenciar a expressão gênica, promover rearranjos cromossômicos e a transferência horizontal de DNA, impactando diretamente a arquitetura e evolução dos genomas de fitopatógenos (Bourque et al., 2018; Oggenfus et al., 2021; Torres et al., 2021; Liu et al., 2025). Recentemente, também foi descrito que os próprios transposons podem ser fatores de patogenicidade, gerando pequenos RNAs que suprimem a resposta imunológica do hospedeiro, favorecendo a infecção (Porquier et al., 2021). Os transposons podem ser classificados de acordo com o nível de autossuficiência funcional (Piego et al., 2015) e de acordo com o mecanismo que utilizam para mudar de um lugar para outro no genoma (Finnegan, 1989). A classificação desses elementos pode ser ainda mais minuciosa, seguindo o nível hierárquico de classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília, como proposto por Wicker et al (2007). Em relação a autossuficiência funcional, eles são denominados autônomos quando codificam todas as sequências necessárias para que haja a transposição e não autônomos quando possuem alguma deficiência estrutural que o impeça de se mover, por isso dependem de proteínas codificadas por outros elementos para transpor (Piego et al., 2015).

No que diz respeito ao mecanismo de transposição, os transposons são divididos em duas classes principais, baseado na molécula intermediária usada no processo de mobilização. Os elementos da Classe I transpõem por meio de um intermediário de RNA, por isso são chamados de retrotransposons. Dessa forma, um RNA é transcrito a partir do transposon e, na

sequência, transcrito reversamente em uma molécula de DNA por uma proteína (transcriptase reversa) codificada pelo próprio elemento. A cópia recém-sintetizada é, então, inserida em uma nova posição. Esse é um mecanismo replicativo, tendo em vista que cada processo de transposição gera uma nova cópia do retrotransposon. Já os elementos da Classe II mobilizam-se diretamente como DNA e podem transpor por mecanismos conservativos ou replicativos. Os elementos da sub-classe I, como os *Tc1-Mariner*, *Mutator*, *PiggyBac* e *CACTA*, realizam transposição conservativa, em que a mobilização requer a excisão do elemento, seguida pela integração em uma nova posição. Esse processo é realizado por uma transposase, codificada pelo próprio transposon, que reconhece o sítio doador e o sítio receptor, e realiza a quebra e junção da ligação fosfodiéster do DNA, necessárias para a transposição. As transposases podem realizar a mobilização tanto do transposon que a originou, como de outras cópias do mesmo elemento. Já os elementos do tipo *Helitron* e *Maverick*, da sub-classe II, apresentam transposição replicativa, e mobilizam-se por meio de um mecanismo de círculo rolante e replicação extracromossômica seguida de reinserção, respectivamente (Finnegan, 1992; Wicker et al., 2007).

Os primeiros trabalhos com elementos transponíveis em fungos filamentosos visavam o estudo individual e detalhado de cada transposon. Uma maneira eficaz de fazer isso era por meio do aprisionamento desses elementos em um gene alvo, em uma estratégia chamada armadilha de transposon (*transposon trap*) (Paun e Kempken, 2015). Doboussi et al. (1992) foram pioneiros no uso do gene *niaD* de *Aspergillus nidulans*, que codifica a enzima nitrato redutase, como armadilha para transposons. O elemento *Fot1*, de *Fusarium oxysporum*, foi identificado como uma inserção dentro do gene *niaD* em mutantes resistentes ao clorato. A clonagem do elemento permitiu a sua caracterização como um *Tc1/Mariner* de 1928 pb, com uma região codificadora flanqueada por repetições terminais invertidas de 44 pb (Daboussi et al., 1992). Posteriormente, diversos elementos ativos foram identificados como inserções no gene que codifica a nitrato redutase, incluindo *Ant1* em *Aspergillus niger* (Glazyer et al., 1995), *Impala* em *F. oxysporum* (Langin et al., 1995), *Flipper* em *Botrytis cinerea* (Levis et al., 1997), *Crawler* em *Aspergillus oryzae* (Ogasawara et al., 2009), entre outros.

Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento, a caracterização individual dos transposons deu lugar a abordagens mais abrangentes, em que todos os elementos de um organismo podem ser caracterizados por meio de análises bioinformáticas realizadas principalmente durante a anotação do seu genoma. Contudo, os estudos iniciais deixaram uma contribuição muito importante ao revelar a capacidade mutagênica dos elementos transponíveis.

A partir desse conhecimento, esses elementos começaram a ser usados como ferramentas moleculares para mutagênese insercional aleatória, em que os genes mutados são recuperados com facilidade usando a sequência do elemento transponível como marcador, por meio de abordagens baseadas em PCR e sequenciamento (Kempken, 2003; Paun e Kempken, 2015; Daboussi e Capy, 2003). A aplicação de transposons para este fim é vantajosa porque a única etapa de transformação necessária é aquela utilizada para inserir o elemento no organismo de estudo, por isso não requer uma alta eficiência de transformação, evitando etapas onerosas de otimização. Além disso, é possível gerar um grande número de mutantes em um único experimento, por meio de ensaios de transposição. O DNA do transposon marca o gene afetado, o que facilita muito a triagem da mutação e possibilita a clonagem do gene sem o conhecimento prévio de sua sequência (Lyon et al., 2024). Os elementos da Classe II são os mais utilizados porque eles são menores, o que facilita a detecção e recuperação do gene inativado (Pereira et al., 2006).

O regulador do metabolismo do nitrogênio, *tnir1* de *Tolyocladium inflatum*, foi o primeiro gene identificado em um fungo filamentosos por meio da marcação por transposon. Para isso, foi utilizado o elemento endógeno da Classe II, da superfamília *hAT*, *Restless* (Kempken e Kuck, 2000). As primeiras aplicações de elementos transponíveis na análise funcional de genes concentraram-se nos ascomicetos (Castanera et al., 2017), sendo *Impala* um dos transposons mais bem-sucedidos para marcação gênica nesse grupo de organismos. O elemento *impala-160* foi isolado de um mutante *niaD* instável de *F. oxysporum* por Langin et al. (1995), pertence a superfamília *Tc1/Mariner*, tem 1280 pb e possui uma ORF que codifica uma transposase de 340 aminoácidos. A região codificadora é flanqueada por sequências terminais invertidas de 37 pb, que são reconhecidas pela transposase na hora da mobilização. Esse elemento transpõe pela exisção e reinserção em uma nova posição, preferencialmente em dinucleotídeos TA, acarretando a duplicação do sítio alvo após inserção. Além disso, *Impala* pode deixar pegadas (*footprints*) na região genômica de onde transpôs (Hua-Van et al., 2001).

Hua-Van et al. (2000) demonstraram a transposição homóloga de *Impala* em *F. oxysporum*, bem com a sua transposição heteróloga na espécie relacionada *Fusarium moliniforme*. A partir desses resultados, *Impala* foi usado com sucesso na análise funcional de genes em diversas espécies. Em *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, esse elemento foi empregado para gerar 746 mutantes insercionais, dos quais 3,5% apresentaram a patogenicidade prejudicada (Migheli et al., 2000). Além disso, o uso de *Impala* permitiu a descoberta do gene *ORP1*, essencial para a penetração nas folhas do hospedeiro, em *Magnaporthe grisea* (Villalba et al.,

2001). Foi demonstrado que *Impala* transpõe eficientemente no hospedeiro heterólogo *Penicillium griseoroseum* e já foi utilizado para marcação de genes essenciais em *Aspergillus fumigatus* (Firon et al., 2003). O sistema de dois componentes *mimp/Impala*, em que o elemento *mimp* é transativado pela transposase de *Impala* foi usado para gerar uma biblioteca de mutantes insercionais de *Fusarium graminearum* (Dufresne et al., 2008). Em um estudo recente foi usado *Impala* para gerar linhagens mutantes de *Geomyces* sp. WNF-15A com potencial aprimorado na produção de pigmento vermelho (Ding et al., 2022).

Outros elementos da Classe II também já foram usados para marcação gênica em fungos filamentosos. A mutagênese insercional mediada pelo transposon *Fot1* foi usada para investigar o mecanismo de biocontrole da linhagem Fo47 de *F. oxysporum*, contra a murcha de Fusarium, causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. lini (Trouvelot et al., 2002). O elemento *Minos*, de *Drodophila hydei*, e *Restless*, de *Tolypocladium inflatum*, foram usados para obtenção de linhagens mutantes de *Geomyces* sp. WNF-15A, capazes de produzir pigmento vermelho em temperaturas normais (Lu et al., 2022). Em leveduras ascomycotas patógenos de humanos, como *Candida albicans* e *Candida glabrata*, os elementos transponíveis são usados em associação com sequenciamento de próxima geração para gerar mutações em todo o genoma, em uma abordagem chamada Tn-seq, visando a descoberta de genes essenciais, bem como a análise do perfil de resistência a medicamentos (Nickels et al., 2018; Segal et al., 2018). Usando a mesma abordagem, foram identificados polimorfismos de essencialidade em genes de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al., 2022). Além disso, foram identificados 532 genes importantes para a reprodução sexuada de *Schizosaccharomyces pombe* (Billmyre et al., 2022)

Em basidiomycetos, a aplicação da mutagênese mediada por transposons visando a análise funcional de genes é ainda pouco documentada. A primeira transposição heteróloga bem-sucedida foi obtida em *Ustilago maydis*, usando um elemento *Tc1/Mariner* de *Caenorhabditis elegans* (Ladendorf et al., 2003). Mais recentemente, por meio da técnica Tn-seq, Billmyre et al. (2024) demonstraram o papel da função mitocondrial na sensibilidade ao fluconazol em *Cryptococcus neoformans*. Nesse estudo, foi utilizado o transposon *Ds* (dissociação) mobilizado pela transposase de Ac (ativador) do milho.

Colleotrichum lindemuthianum é o agente causal da antracnose no feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*). O seu genoma possui 100Mb, um dos maiores já descritos para o gênero, e contém um elevado teor de elementos repetitivos (aproximadamente 60%). Além disso, o genoma é fortemente afetado por RIP (mutação pontual induzida por repetição), um mecanismo

de controle da proliferação de transposons exclusivo de fungos (Silva et al., 2024). *Colletotrichum truncatum* é o agente causal da antracnose em muitas culturas, mas é associado principalmente a ocorrência dessa doença na soja (*Glycine max*). Seu genoma possui 57Mb, dos quais 6,08% correspondem a elementos repetitivos. O genoma de *C. truncatum* também é afetado por RIP, mas de forma mais branda que *C. lindemuthianum* (Rao et al., 2018; Rogério et al., 2020). *Colletotrichum truncatum* possui elementos transponíveis potencialmente ativos em seu genoma (Rao et al., 2018), enquanto *C. lindemuthianum* não possui elementos da Classe II potencialmente ativos (Ferst, 2022, não publicado) e não há informações sobre a atividade de elementos da Classe I.

Nesse contexto, dada a ampla aplicabilidade de *Impala* em diferentes fungos, o objetivo deste trabalho foi testar a transposição heteróloga desse elemento nos genomas dos patógenos do feijão-comum e da soja, visando o desenvolvimento de um sistema de mutagênese insercional aleatória baseado em transposon para estas espécies. A análise da transposição de um elemento heterólogo em contextos genômicos distintos, como os apresentados por *C. lindemuthianum* e *C. truncatum*, pode fornecer informações importantes sobre o comportamento dos transposons nos genomas fúngicos. Assim, este estudo oferece insights sobre as possibilidades e limitações do uso de transposons como ferramenta molecular em estudos de genômica funcional em *Colletotrichum* spp., bem como contribui para avanços no conhecimento acerca da atividade de elementos transponíveis nos genomas de espécies do gênero.

REFERÊNCIAS

- AMUTAN, M. et al. Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger* var. awamori. **Current Genetics**, v. 29, p. 468-473, 1996.
- BARONCELLI, R. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2001, 2017.
- BHUNJUN, C. S. et al. What are the 100 most cited fungal genera? **Studies in Mycology**, v. 108, n. 1, p. 1-412, 2024.
- BILLMYRE, R. B. et al. Saturation transposon mutagenesis enables genome-wide identification of genes required for growth and fluconazole resistance in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **BioRxiv**, 2024.

- BILLMYRE, R. B. et al. Genome-wide quantification of contributions to sexual fitness identifies genes required for spore viability and health in fission yeast. **PLoS Genetics**, v. 18, n. 10, p. e1010462, 2022.
- BOURQUE, G. et al. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology**, v. 19, p. 1-12, 2018.
- CAI, L. et al. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 121-133, 2011.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum*: current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012.
- CHEN, P.; MICHEL, A. H.; ZHANG, J. Transposon insertional mutagenesis of diverse yeast strains suggests coordinated gene essentiality polymorphisms. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1490, 2022.
- CNOSSEN-FASSONI, A. et al. The pectate lyase encoded by the *pecCl 1* gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 461-470, 2013.
- CORDA, A. K. J.; DITMAR, L. P. F.; ROSTKOVIOUS, F. W. T. **Die pilze Deutschlands**. Gedruckt auf Kosten des Herausgebers, 1817.
- DABOUSSI, M-J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 275-299, 2003.
- DABOUSSI, M-J.; LANGIN, T.; BRYGOO, Y. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. **Molecular and General Genetics**, v. 232, p. 12-16, 1992.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, n. 1, p. 1-46, 2019.
- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.
- DING, L. et al. Transposon insertion mutation of *Antarctic psychrotrophic* fungus for red pigment production adaptive to normal temperature. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. kuab073, 2022.
- DUFRESNE, M. et al. Tagging pathogenicity genes in *Fusarium graminearum* using the transposon system *mimp/impala*. **Cereal Research Communications**, v. 36, n.6, p. 415-419, 2008.
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.
- FIRON, A. et al. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 247-255, 2003.

- GLAYZER, D. C. et al. The isolation of *Ant1*, a transposable element from *Aspergillus niger*. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 432-438, 1995.
- GONZAGA, L. L. et al. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 485-496, 2015.
- GUO, Mengjiao et al. Identification of the genes involved in biofilm formation of *Avibacterium paragallinarum* using random transposon mutagenesis. **Veterinary Microbiology**, p. 110410, 2025.
- HYDE, K. D. et al. The numbers of fungi: is the descriptive curve flattening?. **Fungal Diversity**, v. 103, p. 219-271, 2020.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. Mycosphere essay 16: *Colletotrichum*: biological control, biocatalyst, secondary metabolites and toxins. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1164-1176, 2016a.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, 2016b.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 76–100 (2020). **Fungal Diversity**, v. 103, p. 87-218, 2020.
- KEMPKEN, F. Fungal transposable elements: inducers of mutations and molecular tools. In: **Applied Mycology and Biotechnology**. Elsevier, 2003. p. 83-99.
- KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Tagging of a nitrogen pathway-specific regulator gene in *Tolyocladium inflatum* by the transposon *Restless*. **Molecular and General Genetics**, v. 263, p. 302-308, 2000.
- KINGMA, E. et al. Saturated Transposon Analysis in Yeast as a one-step method to quantify the fitness effects of gene disruptions on a genome-wide scale. **PloS One**, v. 20, n. 2, p. e0312437, 2025.
- LADENDORF, O.; BRACHMANN, A.; KÄMPER, J. Heterologous Transposition in *Ustilago maydis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 269, n. 3, p. 395-405, 2003.
- LANGIN, T.; CAPY, P.; DABOUSSI, M-J. The transposable element *Impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 19-28, 1995.
- LEVIS, C.; FORTINI, D.; BRYGOO, Y. *Flipper*, a mobile *Fot1-like* transposable element in *Botrytis cinerea*. **Molecular and General Genetics**, v. 254, n. 6, p. 674-680, 1997.
- LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 75-88, 2013.
- LIU, F.i; CHEEWANGKOON, R; ZHAO, R. Discovery of a New Starship Transposon Driving the Horizontal Transfer of the ToxA Virulence Gene in *Alternaria ventricosa*. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 376, 2025.

- LU, F. et al. *Minos* and *Restless* transposon insertion mutagenesis of psychrotrophic fungus for red pigment synthesis adaptive to normal temperature. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, p. 118, 2022.
- LYON, J. W.; BILLMYRE, R. B.. Recent Advances in High-Throughput Genetics in Fungi. **Fungal Genomics**, p. 51-65, 2024.
- MARCELINO, J. A. P. et al. Entomopathogenic activity of a variety of the fungus, *Colletotrichum acutatum*, recovered from the elongate hemlock scale, *Fiorinia externa*. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 1, p. 13, 2009.
- MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 99-216, 2017.
- MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 36, n. 6, p. 344-355, 1950.
- MÖLLER, M.; STUKENBROCK, E. H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 756-771, 2017.
- MORAGA, J. et al. The current status on secondary metabolites produced by plant pathogenic *Colletotrichum* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, p. 215-239, 2019.
- NABI, A. et al. Optimizing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation conditions in *Colletotrichum lindemuthianum*: a step forward to unravel the functions of pathogenicity arsenals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 293-307, 2022.
- NICKELS, T. J.; CUNNINGHAM, K. W. Tn-seq screens in *Candida glabrata* treated with echinocandins and ibrexafungerp reveal pathways of antifungal resistance and cross-resistance. **mSphere**, p. e00270-25, 2025.
- O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-1065, 2012.
- OGASAWARA, H. et al. Crawler, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6-7, p. 441-449, 2009.
- OGGENFUSS, U. et al. A population-level invasion by transposable elements triggers genome expansion in a fungal pathogen. **Elife**, v. 10, p. e69249, 2021.
- PAUN, L.; KEMPKEN, F. Fungal transposable elements. **Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2**, p. 79-96, 2015.
- PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999.

- PEREIRA, J. F. et al. Elementos transponíveis em fungos fitopatogênicos. **Rev Anual Patol Plant**, v. 14, p. 303-362, 2006.
- PIÉGU, B. et al. A survey of transposable element classification systems—a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 86, p. 90-109, 2015.
- PORQUIER, A. et al. Retrotransposons as pathogenicity factors of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Genome Biology**, v. 22, p. 1-19, 2021.
- RAO, S. et al. The landscape of repetitive elements in the refined genome of chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2367, 2018.
- ROGÉRIO, F. et al. Genome sequence resources of *Colletotrichum truncatum*, *C. plurivorum*, *C. musicola*, and *C. sojae*: four species pathogenic to soybean (*Glycine max*). **Phytopathology**, v. 110, n. 9, p. 1497-1499, 2020.
- SCHENA, L. et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 437-446, 2014.
- SEGAL, E. S. et al. Gene essentiality analyzed by in vivo transposon mutagenesis and machine learning in a stable haploid isolate of *Candida albicans*. **MBio**, v. 9, n. 5, p. 10.1128/mbio, 2018.
- SHIVAPRAKASH, M. R. et al. *Colletotrichum truncatum*: an unusual pathogen causing mycotic keratitis and endophthalmitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2894-2898, 2011.
- SILVA, C. F. B.; MICHEREFF, S. J. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 130-138, 2013.
- SILVA, L. L. et al. What lies behind the large genome of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 5, p. 1459229, 2024.
- SILVA, L. L. et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1891-1904, 2020.
- SILVA, S. S. et al. Influence of plant growth-promoting endophytes *Colletotrichum siamense* and *Diaporthe masirevici* on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Mycology**, v. 13, n. 4, p. 257-270, 2022.
- TALHINHAS, P.; BARONCELLI, R. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.
- TALHINHAS, P. et al. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 73-83, 2015.

THON, M. R.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 12, p. 1356-1365, 2000.

TORRES, D. E.; THOMMA, B. P. H. J.; SEIDL, M. F. Transposable elements contribute to genome dynamics and gene expression variation in the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 7, p. evab135, 2021.

TROUVELOT, Sophie et al. Recovery of *Fusarium oxysporum* Fo47 mutants affected in their biocontrol activity after transposition of the *Fot1* element. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 936-945, 2002.

UDAYANGA, D. et al. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 165-179, 2013.

VAN OPIJNEN, T.; LEVIN, H. L. Transposon insertion sequencing, a global measure of gene function. **Annual Review of Genetics**, v. 54, n. 1, p. 337-365, 2020.

ZHANG, H. et al. A CRISPR/Cas9-based study of CgloRPCYG, a gene that regulates pathogenicity, conidial yield, and germination in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Agronomy**, v. 13, n. 7, p. 1681, 2023.

CAPÍTULO 1

Transposição do elemento *Impala* em *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose no feijão-comum

RESUMO

Colletotrichum lindemuthianum é um importante patógeno do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) acarretando grandes perdas de rendimento da cultura em condições ideais. Além disso, por apresentar estilo de vida hemibiotrófico, essa espécie é alvo de estudos para compreensão da base molecular de patogênese. Diversas estratégias genéticas já foram empregadas para *knockout* de genes relacionados a patogenicidade em *C. lindemuthianum*. Contudo, o potencial dos elementos transponíveis como ferramenta molecular para análise funcional de genes permanece inexplorado nessa espécie. *Impala* é um transposon da Classe II, da superfamília *Tc1/Mariner*, isolado de *Fusarium oxysporum*, que transpõe eficientemente em hospedeiros heterólogos e já foi utilizado com sucesso para marcação de genes envolvidos na patogenicidade em *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis*. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo testar a transposição heteróloga de *Impala* em *C. lindemuthianum* para desenvolver um sistema de mutagênese insercional aleatória baseado em transposon para esta espécie. Um mutante defectivo para a enzima nitrato redutase foi usado como linhagem receptora em um ensaio fenotípico baseado na restauração da funcionalidade do gene (*niaD::Impala*) pela excisão de *Impala*. Foram isoladas 3 linhagens contendo *niaD::Impala* em diferentes posições no genoma: T26 com duas cópias e T31 e T6 com apenas uma cópia. Onze colônias revertentes $NiaD^+$ provenientes da linhagem T26 foram isoladas por meio de um ensaio para detecção da transposição de *Impala* em meio mínimo contendo nitrato. A análise por meio de Southern Blot confirmou a transposição de *Impala* nos revertentes de *C. lindemuthianum* avaliados. *Impala* transpôs em uma taxa de $0,74/10^6$ conídios e o resultado da hibridização revelou que o elemento reinseriu em uma nova posição genômica em 71% dos revertentes analisados. Tratamentos de estresse, incluindo choque térmico, pH alcalino, estresse osmótico, estresse oxidativo e exposição ao sulfato de cobre, foram aplicados visando ao aumento do número de revertentes $NiaD^+$. Entretanto, os estressores testados não promoveram um aumento significativo no número de revertentes, tanto em comparação com o controle quanto entre si. Este estudo mostrou pela primeira vez a transposição heteróloga em *C. lindemuthianum*, revelando seu potencial e suas limitações para utilização em ensaios de mutagênese insercional. Esse conhecimento contribui para o avanço nos estudos de genética funcional nesta espécie, ampliando o entendimento da aplicabilidade dos elementos transponíveis como agentes mutagênicos no gênero *Colletotrichum*.

Palavras-chave: Mutagênese insercional. Transposon. Genômica Funcional.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos alimentos mais tradicionais na dieta do brasileiro, principalmente por seu baixo custo e alto valor nutricional (Mesquita et al., 2007). O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção do grão, que é cultivado em todo o território do país, principalmente por pequenos e médios produtores (Ganascini et al., 2019; FAOSTAT, 2023). Esse contexto reforça a importância cultural, social e econômica do grão. Embora a produção seja alta, muitos fatores contribuem para a redução da produtividade do feijão-comum, especialmente as doenças causadas por fungos (Mahmoud, 2021). Entre elas, a antracnose se destaca como uma das mais prejudiciais, principalmente em regiões subtropicais e temperadas, onde o clima favorece o seu desenvolvimento. A doença pode comprometer a germinação das sementes, reduzir o vigor das plântulas e causar a morte de plantas infectadas, resultando em perdas significativas de rendimento. Além disso, a antracnose também afeta as vagens e sementes, causando manchas e imperfeições, reduzindo a qualidade do produto e afetando seu valor no mercado (Sharma et al., 2008).

Os sintomas da doença podem afetar toda a parte aérea da planta, e as perdas são maiores quando o feijoeiro é infectado precocemente. Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem na face abaxial, como manchas marrons nas nervuras que, posteriormente, podem aparecer também na parte superior. Nas vagens surgem lesões cor de ferrugem, que podem evoluir para um cancro aprofundado, circundado por um anel marrom/preto mais elevado. As sementes doentes podem apresentar descoloração, enrugamento e cancro marrom escuro (Schwartz e Corrales, 1989).

O agente causal da antracnose no feijoeiro, *Colletotrichum lindemuthianum* (Saccardo & Magnus) Briosi & Cavara, é um ascomiceto, faz parte do complexo de espécies *Colletotrichum orbiculare*, e apresenta estilo de vida hemibiotrófico. No estágio de biotrofia, os sintomas da doença ainda não são perceptíveis, ao passo que o fungo se nutre das células hospedeiras sem provocar alterações visíveis. Com o desenvolvimento das hifas secundárias, o patógeno passa para o estágio necrotrófico, no qual ocorre a secreção de enzimas e toxinas que degradam o tecido vegetal, permitindo a visualização do principal sintoma, que é a necrose do tecido afetado (Perfect et al., 2001; Padder et al., 2017).

Na fase biotrófica, o conídio germina, dando origem a um tubo germinativo, que posteriormente se diferencia em um apressório melanizado. Do apressório sai uma hifa de penetração (PEG), que por força mecânica e auxílio de atividade enzimática local, penetra as células epidérmicas do feijoeiro. Após a penetração, é formada a vesícula de infecção, de onde

saem as hifas primárias. Entre as hifas primárias e as células hospedeiras existe uma matriz composta de polissacarídeos e glicoproteínas, importante para que o patógeno se estabeleça sem ativar as defesas da planta. Na fase necrotrófica, as hifas secundárias são formadas e enzimas líticas são secretadas, levando a necrose do tecido hospedeiro. Para concluir o ciclo de infecção, o fungo produz o acérvulo, onde são formados os conídios, que ficam envoltos por uma mucilagem, responsável por protegê-los da dessecação. Ao entrar em contato com gotas de água, provenientes de irrigação ou chuva, por exemplo, os conídios podem se espalhar para outras partes da mesma planta ou para novas plantas hospedeiras, iniciando outro ciclo de infecção (Schwartz e Corrales, 1989; O'Connel e Bailey et al., 1991)

Colletotrichum lindemuthianum possui um dos maiores genomas relatados para o gênero *Colletotrichum*, com um alto conteúdo de elementos repetitivos (Queiroz et al., 2017; Lopes et al., 2024). Além disso, é conhecido por sua elevada variabilidade genética, com pelo menos 298 raças fisiológicas descritas ao redor do mundo (Nunes et al., 2021). A variabilidade genética relatada possibilita que o fungo se adapte ao ambiente, superando as limitações impostas pelos principais mecanismos de controle, que atualmente são os fungicidas e as cultivares resistentes (Nabi et al., 2022).

Espécies do gênero *Colletotrichum* são modelos ideais para a compreensão da base molecular da interação planta-patógeno, devido ao estilo de vida hemibiotrófico (O'Connel et al., 1985; Perfect et al., 1999; Yan et al., 2018). Estudos da interação entre *C. lindemuthianum* e *Phaseolus vulgaris* foram pioneiros na elucidação da especificidade raça-cultivar e na descoberta da relevância das fitoalexinas para a defesa das plantas (Barrus, 1911; Rahe et al., 1969; Latunde-Dada, 2001). Abordagens genéticas diretas e reversas já foram aplicadas para knockout de genes relacionados a patogenicidade em *C. lindemuthianum*, incluindo o uso de vetores de substituição associados a transformação mediada por protoplastos (Pellier et al., 2003) ou transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Hoi et al., 2007; Silva et al., 2021), Integração Mediada por Enzimas de Restrição (REMI) (Nogueira et al., 2019) e Split Marker (Cnossen-Fassoni et al., 2013).

Recentemente, Nabi et al. (2022) otimizaram as condições de transformação mediada por *A. tumefaciens* e conseguiram gerar uma biblioteca de 1200 mutantes insercionais, entre eles 120 mutantes apresentaram alterações na patogenicidade. Essa abordagem é interessante porque a mutagênese aleatória permite a descoberta de novos genes essenciais para a interação planta-patógeno. O emprego desta técnica em *C. lindemuthianum* também permitiu a obtenção de seis mutantes insercionais contendo o GFP (gene da proteína verde fluorescente), os quais

apresentaram variações morfoculturais. A análise desses mutantes contribuiu para uma compreensão mais aprofundada da colonização do hospedeiro e também proporcionou a elucidação do papel desempenhado pelos radicais livres no processo de infecção (Nabi et al., 2024). Elementos transposniveis também são ferramentas moleculares poderosas para a mutagênese insercional aleatória porque permitem a geração de um grande número de mutantes em um único experimento. A sua aplicação pode ser mais vantajosa que a ATMT, considerando que não é necessária uma alta eficiência de transformação, o que dispensa etapas onerosas de otimização. Entretanto, o uso desses elementos como ferramenta molecular para genômica funcional em *C. lindemuthianum* permanece inexplorado.

Elementos transponíveis, ou transposons, são sequências de DNA capazes de mudar de um local para outro no genoma e essa característica possibilita que eles sejam usados como agentes mutagênicos, ao passo que eles podem se inserir dentro de genes, levando a sua inativação. Os transposons são comumente classificados de acordo com o mecanismo de transposição. Assim, os elementos da Classe I são transcritos em RNA e transcritos reversamente em DNA, por isso são chamados de retrotransposons. Já os elementos da Classe II transpõem diretamente como DNA, por meio da excisão e reinserção em um novo sítio, ou por meio de transferência de uma das fitas. Eles também são classificados como autônomos quando codificam todos os elementos necessários para a sua mobilização (Wicker et al., 2007). Os elementos da Classe II são os mais utilizados em sistemas de mutagênese insercional, por serem menores e de fácil manipulação. *Fot1*, *Impala* e *Minos*, da superfamília *Tc1/Mariner* (Trouvelot et al., 2002; Villalba et al., 2001; Ding et al., 2021; Lu et al., 2022), e o transposon *Restless* (Lu et al., 2022) da superfamília *hAT* foram utilizados com sucesso para a geração de mutantes insercionais em fungos filamentosos.

O elemento *Impala* foi identificado em *Fusarium oxysporum* e demonstrou transpor eficientemente em uma ampla gama de hospedeiros heterólogos (Daboussi e Capy, 2003). Ele possui aproximadamente 1,3 kpb, é flanqueado por repetições terminais invertidas (TIRs) de 37 pb e tem uma única ORF que codifica uma transposase de 340 aminoácidos. Durante a transposição, a transposase reconhece as TIRs e catalisa a excisão e reinserção do elemento em um novo local (Hua-Van et al., 2001a). A eficiência de transposição de *Impala* em outros fungos e o sucesso de sua aplicação para marcação de genes envolvidos na patogenicidade (Migheli et al., 2000), bem como para elucidação de genes essenciais (Firon et al., 2003) e genes envolvidos na produção de compostos industrialmente importantes (Ding et al., 2021), nos levou a analisar in vivo a sua atividade em *C. lindemuthianum*. Até o momento não existem estudos que

explorem o potencial dos elementos transponíveis como ferramenta de manipulação genética nesse fitopatógeno. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar a transposição heteróloga de *Impala* visando ao desenvolvimento de um sistema de mutagênese insercional aleatória baseado em transposon para esta espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos com o mutante auxotrófico de *C. lindemuthianum*, Nit1⁻I18 defeitivo para a enzima nitrato redutase obtido a partir da linhagem A₂ 2-3, da raça fisiológica 89 (Rosa, 2022; não publicado) e a linhagem selvagem, pertencentes ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados foram preservados pelo método Castellani (1939).

Foi utilizado o meio Batata Dextrose Ágar, BDA (glicose 20g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹, batata 200g.L⁻¹) para cultivo dos isolados e o meio YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 2 g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹) para esporulação, a uma temperatura de incubação de 22°C. Para obtenção de micélio, uma suspensão de conídios (1x10⁶conídios/mL) foi colocada em meio GPYECH (glicose 20 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, caseína hidrolisada 1 g.L⁻¹) e incubada sob agitação a 180 rpm, a 22°C por um período de 3 a 5 dias.

2.2 Plasmídeos

No experimento de co-transformação, foram utilizados os plasmídeos pAN7.1 (Punt et al., 1987) e pNIL160 (Villalba et al., 2001b). O plasmídeo pAN7.1, utilizado como marcador de seleção dos transformantes, contém o gene da higromicina B fosfotransferase de *Escherichia coli* sob o controle do promotor do gene *gpd* e do terminador do gene *trpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*. O plasmídeo pNIL160 apresenta um fragmento clonado no vetor pUC19, contendo uma cópia do elemento *Imp160*, derivado de *F. oxysporum*, inserida no promotor do gene *niaD* de *A. nidulans*. Os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α , por meio de choque térmico de acordo com Sambrook e Russel (2001). A extração dos plasmídeos foi feita através de lise alcalina, conforme descrito por Heilig et al. (1998) e o armazenamento foi feito em água ultrapura estéril a -20°C.

2.3 Co-transformação genética

A transformação genética foi realizada a partir de protoplastos, utilizando PEG/CaCl₂, conforme descrito por Soares et al. (2014), com algumas modificações. A preparação dos protoplastos envolveu o tratamento de 0,8 a 1 g de micélio fúngico com 10 mL de KCl 0,8M em tampão fosfato 10 mM (pH 5,8) e 15 mg/mL de Lysing Enzyme (Sigma), com incubação a 32°C, 80 rpm, por até 3 horas. Os protoplastos foram separados do micélio por filtração utilizando seringas com gaze estéril e, em seguida, lavados três vezes por centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 10 mL de solução ST (Sorbitol 1M, Tris HCl 0,01M), e a terceira com 5 mL de solução STC (ST suplementado com 0,05 M de CaCl₂). Os protoplastos foram ressuspensos em STC na concentração de 1x10⁶ protoplastos/mL. Para a co-transformação, foram utilizados 5 µg de DNA de cada plasmídeo, 200 µL da suspensão de protoplastos e 50 µL de polietilenoglicol 6000 60%, com 50 mM de CaCl₂. A mistura foi mantida em gelo por 20 minutos. Em seguida, foram acrescentados 500 µL da mesma solução de polietilenoglicol, e a mistura foi colocada à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 750 µL de STC, completando o volume para 1,5 mL. A regeneração dos protoplastos foi feita em meio BDA contendo sacarose (0,56 M) como estabilizador osmótico e incubada a 22°C. Após 48 horas de incubação, foi adicionado 10 mL de BDA contendo higromicina (80 µg/mL) em cada placa. Os transformantes resistentes a higromicina foram transferidos para um novo meio de cultura contendo 80 µg/mL do antibiótico. Na sequência, foi realizada a purificação monospórica dos transformantes estáveis e eles foram preservados pelo método de Castellani (1939).

2.4 Isolamento de colônias revertentes

Uma suspensão de conídios (1×10⁶ conídios/mL) foi inoculada pelo método *pour plate* em placas de Petri contendo meio mínimo CZAPEK-DOX. Para cada co-transformante, foram utilizadas 15 placas, que foram incubadas a 25°C até o surgimento de colônias com crescimento vigoroso. Após o período de incubação, as linhagens revertentes foram transferidas para novas placas contendo meio mínimo CZAPEK-DOX. Em seguida, foi realizada a purificação monospórica (Queiroz e Daboussi, 2003).

2.5 Caracterização molecular dos cotransformantes e dos revertentes

Os primers SPE5 (5'-AGAACACAACCCTGCCACGG-3') e SPE3 (5'-TCCGGGCCGTATGCACAGAG-3'), que amplificam 573 pb da região codificadora da transposase do *Impala*, foram utilizados para verificar quais linhagens resistentes a higromicina receberam o plasmídeo pNIL160. Foi realizada uma extração rápida, por meio da maceração de um disco de micélio em 500 µL do tampão de extração (SDS 0,2%, EDTA 50 mM), seguida de incubação a 65°C por 30 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e 0,5 volumes de acetato de amônio 7,5M e 1,5 volumes de isopropanol foram adicionados. A amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. Os pellets formados foram lavados com etanol 70% e ressuspensos em água ultrapura estéril. Uma alíquota de 1 µL de DNA foi usada para a PCR tradicional, em uma reação de 25 µL, contendo 1 µL da enzima Taq DNA polimerase (Cellco, São Paulo, Brasil). O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida por 33 ciclos de: 95°C por 20 s, 57°C por 20 s, 72°C por 1 min e 40 s, com extensão final 72°C por 2 minutos.

Foi realizada a caracterização molecular dos transformantes confirmados por PCR e dos revertentes por Southern Blot, seguindo as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001). O DNA total foi extraído dos transformantes conforme descrito por Specht et al. (1982) e alíquotas de 5 µg de DNA foram digeridas com a enzima *ApaI*, que cliva o plasmídeo pNIL160 em um único sítio, sem clivar *Impala*. A sonda foi construída com o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science), usando os primers SPE5 e SPE3. A hibridização e detecção foram feitas com o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Applied Science), seguindo as recomendações do fabricante.

2.6 Tratamentos de estresse

O experimento consistiu na contagem do número de colônias revertentes (*NiaD*⁺) em diferentes condições de estresse aplicadas a conídios do transformante T26. Foram testados seis tratamentos: controle (sem estresse), choque térmico, NaCl 1M, H₂O₂ 10 mM, CuSO₄ 100 Mm, conforme descrito por Ogasawara et al. (2009), e pH 9. Cada tratamento teve 10 repetições independentes.

No tratamento de choque térmico, os conídios foram suspensos em água estéril e incubados em banho maria a 42°C, por 3 horas. Na sequência, suspensões de 1x10⁶conídios/mL foram espalhadas em placas de Petri contendo meio CZAPECK-DOX.

Para o tratamento em pH alcalino, os conídios foram suspensos em uma solução tampão de fosfato de sódio monobásico anidro 0,4M, ajustada para pH 9. Nos demais tratamentos, suspensões de conídios foram preparadas em água destilada estéril contendo NaCl 1M, H₂O₂ 10 mM e CuSO₄ 100 mM. Na sequência, as suspensões de conídios de cada tratamento foram mantidas sob agitação a 180 rpm, 22°C, por 6 horas. Uma alíquota de 1x10⁶ conídios/mL foi espalhada em placas de petri contendo meio CZAPECK-DOX.

Todas as placas foram incubadas a 22°C, por 30 dias. Como controle, uma suspensão de conídios (1x10⁶ conídios/mL) foi inoculada em 10 placas contendo meio CZAPECK-DOX, e incubada sob as mesmas condições.

Ao final do tempo de incubação, o número de colônias revertentes foi contado para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística no software R, por meio da plataforma PositCloud. Inicialmente, foram calculadas a média e a variância das contagens para cada tratamento. Devido à presença de sobredispersão nos dados, foi ajustado um modelo de regressão binomial negativa. A partir desse modelo, foram realizados testes para verificar se os tratamentos diferem do controle, bem como entre si, por meio de comparações múltiplas utilizando o teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes foi $\alpha = 0,5$.

3. RESULTADOS

Para testar a transposição de *Impala* no genoma de *C. lindemuthianum* foi usada a mesma abordagem descrita por Villalba et al. (2000) para *M. grisea*. Um total de 45 colônias resistentes a higromicina foram selecionadas em meio BDA contendo 80 ug/mL do antibiótico, o que representa uma eficiência de transformação de 9 transformantes por ug de DNA. Ao passar por um novo meio seletivo, 45% dos transformantes não se desenvolveram, o que representa uma taxa moderada de instabilidade mitótica. Os transformantes estáveis foram testados por PCR quanto a integração do plasmídeo pNIL160, usando primers que amplificam 573 pb da região codificadora da transposase do *Impala* (dados não mostrados). Dezenove transformantes apresentaram integração de *Impala* no genoma e 5 deles foram analisados por Southern Blot, a fim de verificar o perfil de integração de pNIL160, usando um fragmento da sequência que codifica a transposase de *Impala* como sonda.

O DNA total dos transformantes foi digerido com a enzima *ApaI*, que cliva o plasmídeo em um único sítio, de modo que cada banda observada na membrana representou uma integração do plasmídeo. O resultado da hibridização revelou que os transformantes T31 e T6 receberam apenas uma cópia do pNIL160, enquanto o transformante T26 recebeu duas cópias. Os transformantes T22 e T20 não apresentaram sinais de hibridização, o que sugere a não integração de pNIL160 (Figura 1). A ausência de bandas para o mutante Nit1-I18 demonstra que *C. lindemuthianum* não possui cópias endógenas do *Impala*.

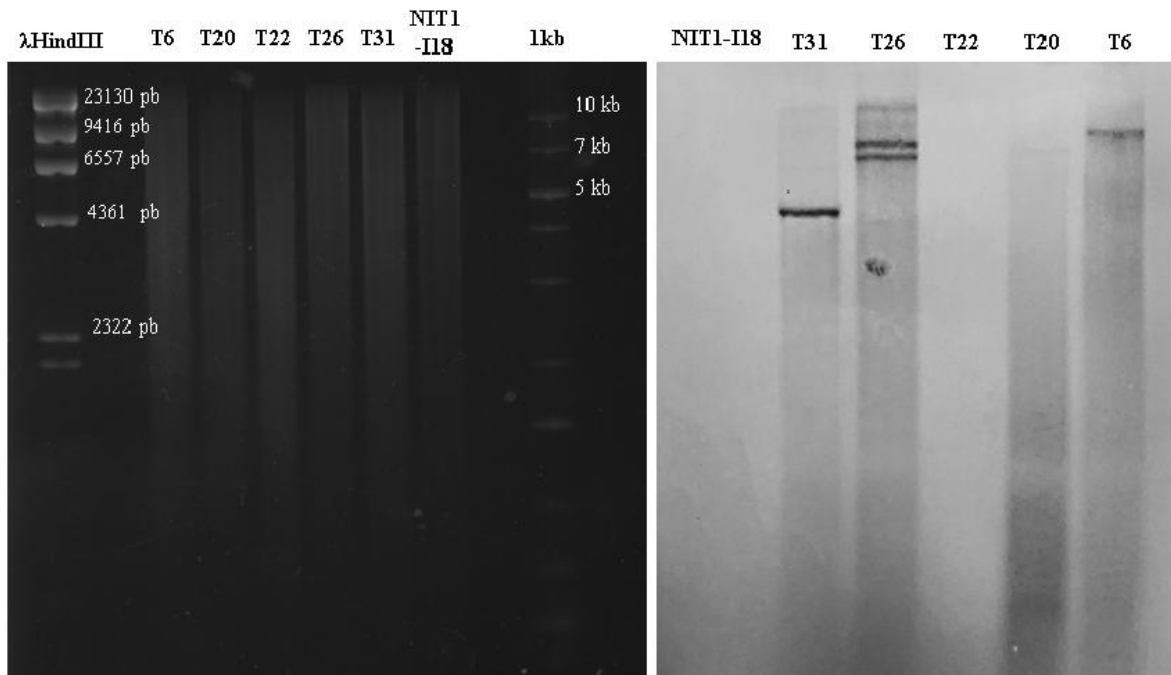


Figura 1. Caracterização molecular dos transformantes de *Colletotrichum lindemuthianum* para verificar o perfil de integração de pNIL160. A linhagem Nit1-I18 é o mutante para a nitrato redutase utilizado na transformação; T31, T26, T22, T20 e T6 são os diferentes transformantes obtidos neste estudo. O DNA foi clivado com a enzima de restrição *ApaI*, separado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com um fragmento de 573 pb do gene que codifica a transposase de *Impala*. Cada banda observada na membrana representa uma cópia do plasmídeo pNIL160.

Os transformantes T31 e T26 foram submetidos ao ensaio de excisão fenotípica, para verificar se *Impala* é capaz de transposição do gene *niaD*. O mutante Nit1-I18 foi usado como controle negativo (Figura 2B). Nesse ensaio, a restauração da funcionalidade do *niaD*, pela excisão de *Impala* da sua região promotora, permite o crescimento do fungo em MM + nitrato. Assim, os eventos de transposição são identificados visualmente pelo aparecimento de colônias com fenótipo *NiaD*⁺, que apresentam crescimento vigoroso (revertentes), sobre um fundo de micélio esparso (mutantes) (Figura 2A). O transformante T31 não apresentou revertentes, enquanto o transformante T26 apresentou 11 colônias revertentes, o que representa uma taxa de excisão de 0,74 por 10⁶ conídios plaqueados. A taxa de excisão é calculada com base no número de colônias com fenótipo *NiaD*⁺ que surgem em placas inoculadas com um número fixo de conídios. O fenótipo dos revertentes é comparado ao do mutante Nit1-I18 em meio mínimo contendo nitrato na Figura 2C.

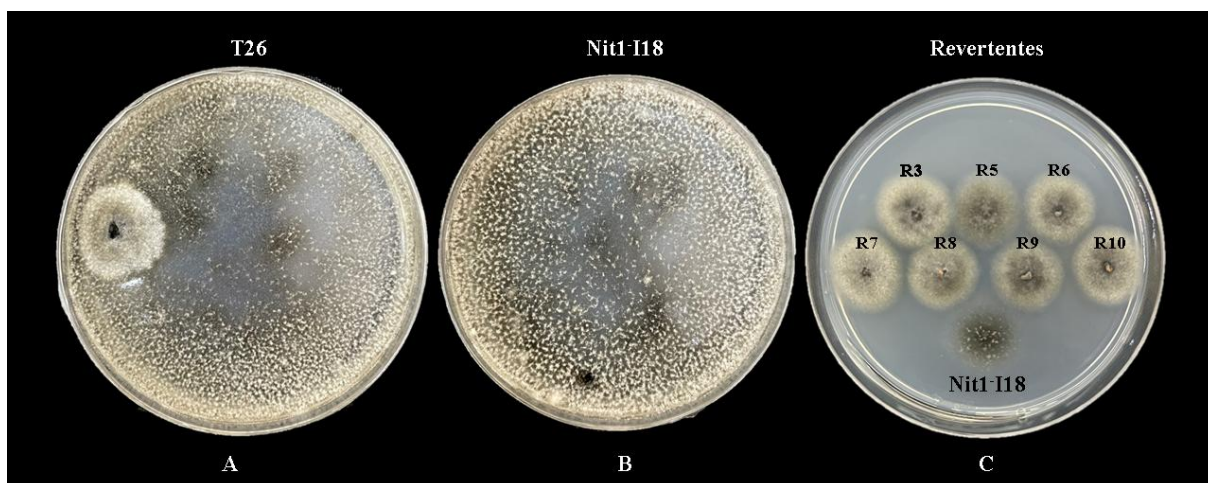


Figura 2. Ensaio de reversão da mutação *niaD::Impala* em *Colletotrichum lindemuthianum*. (A) Crescimento de uma colônia com fenótipo *NiaD*⁺ restaurado pela excisão do *Impala* em meio mínimo contendo nitrato. (B) Ausência de crescimento vigoroso do mutante Nit1-I18 em meio mínimo contendo nitrato. (C) Crescimento dos revertentes R3, R5, R6, R7, R8, R9 e R10 e do mutante Nit1-I18 em meio mínimo contendo nitrato.

Os revertentes obtidos foram analisados por Southern Blot usando parte do gene da transposase de *Impala* como sonda a fim de verificar a capacidade do transposon de excisar e reinserir em um novo sítio (Figura 3). Os revertentes R10, R9, R7 e R5 apresentaram um padrão semelhante: uma cópia do elemento não sofreu transposição, como indicado pela banda na mesma posição do transformante T26, enquanto a outra cópia do elemento excisou e reinseriu

em um novo sítio no genoma, resultando em bandas em novas posições. Para o revertente R3, uma cópia excisou e reinseriu em um novo sítio, enquanto a outra cópia excisou e não reinseriu em um novo local. Os revertentes R8 e R6 não apresentaram bandas, possivelmente porque ambas as cópias foram excisadas sem reinserção em um novo local. Esses dados indicam uma frequência de reinserção de aproximadamente 71%.

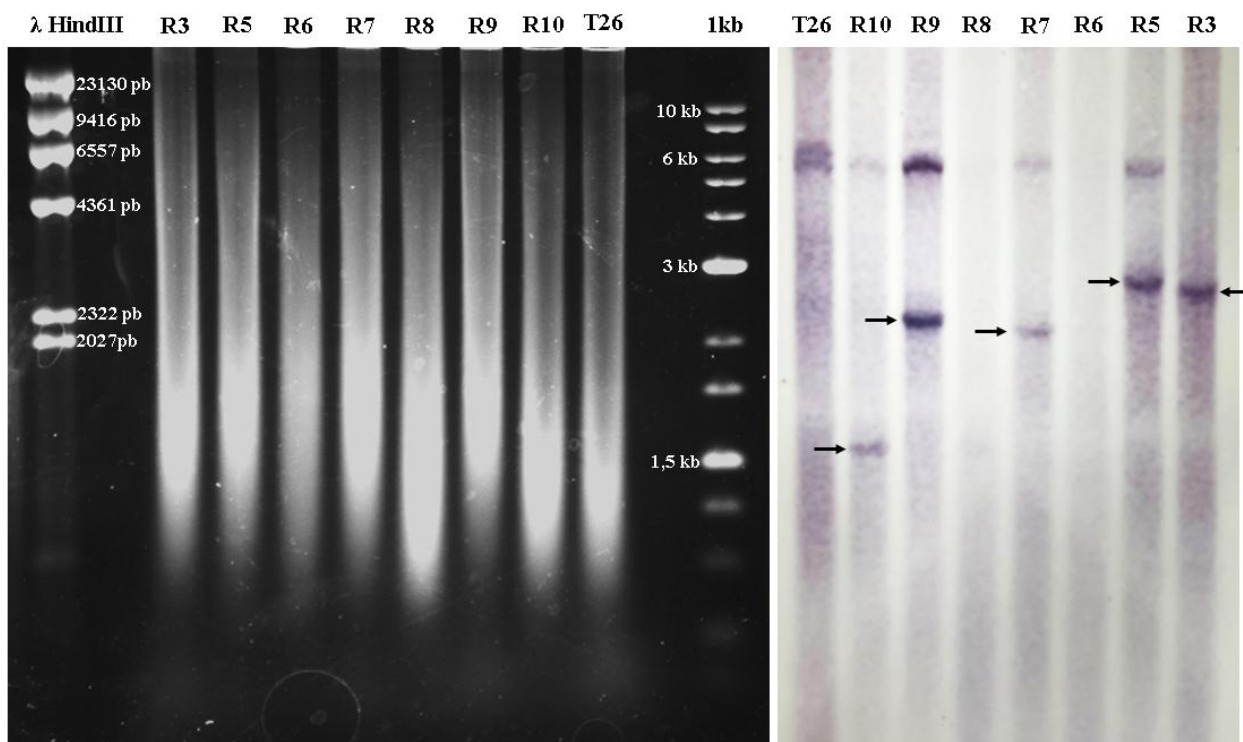


Figura 3. Caracterização molecular dos revertentes $NiaD^+$ derivados do transformante T26. O DNA total dos isolados foi clivado com *ApaI*, separado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com o *Impala*. As setas indicam as inserções de *Impala* em novas posições. As duas bandas observadas na canaleta indentificada como T26 representam as duas cópias do plasmídeo pNIL160 nesse transformante.

Diferentes condições de estresse foram testadas, na tentativa de otimizar o uso de *Impala* como ferramenta de mutagênese, visando ao aumento do número de candidatos a mutantes insercionais pela restauração do fenótipo $NiaD^+$. Os estressores avaliados foram: choque térmico, pH alcalino, estresse osmótico, estresse oxidativo e exposição ao sulfato de cobre. Os resultados obtidos são mostrados com detalhes no Apêndice A. A contagem do número de colônias revertentes ($NiaD^+$) para cada tratamento está descrita na Tabela A.1. A partir desses dados, foram calculadas a média e a variância para cada tratamento (Tabela A.2). Como foi observada sobredispersão nos dados, foi ajustado um modelo de regressão binomial negativa

(Tabela A.3). O modelo indicou que nenhum dos tratamentos diferiu significativamente da condição controle, considerando significativos apenas os p-valores menores que 0,05. Entretanto, é possível observar que o tratamento com pH alcalino obteve maior efeito sobre o número de colônias revertentes, enquanto o tratamento com estresse oxidativo apresentou o menor efeito. As comparações múltiplas pelo teste de Tukey também não apontaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Tabela A.4).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi testado pela primeira vez a transposição heteróloga em *C. lindemuthianum* e foi mostrado que *Impala* é ativo no genoma desta espécie. Foi observada uma taxa de excisão de aproximadamente $0,74/10^6$ conídios plaqueados, o que se aproxima do que foi descrito para *Penicillium griseoroseum* (Queiroz e Daboussi, 2003) e *Aspergillus nidulans* (Li Destri Nicosia et al., 2001). Entretanto, o número de excisões por conídios plaqueados é mais de 100 vezes menor do que o observado para *M. grisea* (Villalba et al., 2000) e *F. oxysporum* f.sp. melonis (Mighelli et al., 2000). Essa diferença drástica pode ser atribuída às particularidades dos genomas desses fungos.

Magnaporthe grisea e *F. oxysporum* parecem suportar a existência de muitos elementos ativos em seus genomas. De fato, vários elementos completos já foram isolados nessas espécies, como *Occan*, *Grasshopper*, *Pot2* e *MAGGY* em *M. grisea* (Dobinsons et al., 1992; Kachroo et al., 1994; Farman et al., 1996; Kito et al., 2003) e *Fot1*, *Impala*, *Tfo1* e *Drifter* em *F. oxysporum* (Daboussi et al., 1992; Okuda et al., 1998; Huan-Van et al., 2001; Rep et al., 2005). Em contrapartida, uma busca detalhada pelos elementos da Classe II no genoma de *C. lindemuthianum* revelou que a maioria das cópias da superfamília *Tc1/Mariner* encontradas estavam degeneradas e os poucos elementos completos identificados possuíam suas ORFs de transposases putativas interrompidas por múltiplos códons de parada (Ferst, 2023, não publicado). Além disso, análises in silico realizadas por Lopes et al. (2024) revelaram que o genoma desta espécie é fortemente afetado por RIP, um mecanismo de defesa contra transposons exclusivo de fungos (do inglês *Repeat-Induced Point mutation*). Esses resultados sugerem que, apesar de *Impala* ter se mostrado ativo em *C. lindemuthianum*, esse fungo parece exibir uma forte tendência a controlar negativamente a atividade de elementos transponíveis, possivelmente tornando o seu genoma um lugar hostil para eventos de transposição.

Já foi descrito que estressores ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos, podem atuar sobre a atividade de elementos transponíveis, levando a sua desrepressão (Fouché et al., 2020).

Sendo assim, foram avaliadas algumas condições de estresse, conhecidas por induzir a transposição em outros organismos, com intuito de aumentar o número de candidatos a mutantes insercionais. As condições testadas foram as mesmas utilizadas para avaliar os efeitos na transposição de *Crawler*, um elemento que apresenta altos níveis de identidade de sequência com *Impala*, em *A. oryzae* (Ogasawara et al., 2009), com exceção do pH alcalino. Os tratamentos incluíram choque térmico, pH alcalino, estresse osmótico, estresse oxidativo, e exposição ao sulfato de cobre. No presente estudo, os resultados indicaram que a aplicação dessas condições de estresse não resultou em diferenças significativas no número de colônias revertentes obtidas, quando comparadas ao tratamento controle (sem estresse). Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. Assim, esses dados indicam que os tratamentos avaliados não demonstraram aplicação prática para otimização do uso de *Impala* como ferramenta de mutagênese insercional em *C. lindemuthianum*. Entretanto, não é possível dizer que os estressores analisados não têm efeito sobre a transposição de *Impala*, uma vez que eles não foram testados quanto a sua influência na viabilidade dos conídios.

Outros fatores também devem ser considerados quanto a sua influência na atividade de *Impala*, como o papel da cromatina na região de inserção original do transposon (Di Estefano, 2022) e o efeito do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) sobre a transposição (Lax et al., 2020). O mecanismo de RNA de interferência desempenha um papel importante no controle da atividade de transposons em fungos (Fulci e Macino, 2007; Nicolas e Garre, 2017), portanto a hipótese de que a transposição de *Impala* pode estar sendo controlada negativamente por este mecanismo deve ser considerada. As proteínas Dicer são um dos principais componentes do RNAi canônico de fitopatógenos (Nicolas e Garre, 2017), de modo que o *knockout* de uma delas ou de ambas pode levar a linhagens deficientes nesse mecanismo. Estudos não publicados realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o *knockout* de Dicer1 e Dicer2 em *C. lindemuthianum* não altera a patogenicidade desse fungo (Magalhães, 2022, não publicado). Assim, a inserção de *Impala* em uma linhagem de *C. lindemuthianum* deficiente para o mecanismo de RNA de interferência pode ser uma boa estratégia para testar essa hipótese. Se o RNAi realmente regula negativamente a mobilização de *Impala*, a inserção do elemento em uma linhagem deficiente neste mecanismo pode ser uma maneira de otimizar o sistema de mutagênese para obtenção de um número maior de candidatos a mutantes insercionais, pelo aumento do número de transposições de *Impala*.

Além de uma elevada taxa de excisão, um sistema de mutagênese insercional eficiente também requer uma frequência elevada de reinserção do transposon, preferencialmente dentro

ou próximo de regiões codificadoras. A análise de Southern Blot mostrou que *Impala* apresentou uma frequência de reinserção de aproximadamente 71%. Esse valor se aproxima do que foi observado para *Penicillium griseoroseum* (Queiroz e Daboussi, 2003), *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis (Migheli et al., 2000), *Fusarium moliniforme* (Huan-Van et al., 2001) e *Magnaporthe grisea* (Villalba et al., 2001). Esses dados indicam que *Impala* apresenta uma frequência de reinserção adequada para sua aplicação como ferramenta de mutagênese em *C. lindemuthianum*.

A hibridização revelou que *Impala* reinsereu em diferentes locais no genoma do patógeno do feijão-comum, sugerindo que a reinserção pode ter sido aleatória e o que os eventos de transposição foram independentes, o que é desejável para este sistema. Os dados apresentados reforçam a proposta de que *Impala* possui um mecanismo de transposição conservado, que independe de características inerentes do hospedeiro (Plasterk et al., 1999). Para verificar se a mobilização desse elemento mantém o mesmo nível de conservação descrito anteriormente, outras análises podem ser feitas, como o uso de técnicas baseadas em sequenciamento para investigar as pegadas deixadas durante a transposição e para investigar possíveis padrões de reinserção.

5. CONCLUSÃO

Este estudo relata pela primeira vez a transposição heteróloga em *Colletotrichum lindemuthianum*. Foi demonstrado que *Impala* é ativo no genoma dessa espécie e os resultados indicam seu potencial como ferramenta de mutagênese insercional aleatória neste fitopatógeno. Entretanto, para que esse potencial seja melhor aproveitado, otimizações precisam ser realizadas visando aumentar a taxa de transposição de *Impala*. Isso pode ser alcançado pela inserção do elemento em uma linhagem deficiente para o um dos sistemas de controle de transposons, o mecanismo de RNA de interferência.

Os resultados apresentados fornecem insights importantes sobre as possibilidades e limitações do uso de transposons como ferramenta molecular em *C. lindemuthianum*. Esse conhecimento contribui para o avanço nos estudos de genética funcional nesta espécie, ampliando o entendimento da aplicabilidade dos elementos transponíveis como agentes mutagênicos no gênero *Colletotrichum*.

6. REFERÊNCIAS

- BARRUS, M.F. **Variation of varieties of beans in their susceptibility to anthracnose.** 1911.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 15, p. 225-226, 1939.
- CNOSSEN-FASSONI, A. et al. The pectate lyase encoded by the *pecCl 1* gene is an important determinant for the aggressiveness of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 461-470, 2013.
- DABOUSSI, M-J; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 275-299, 2003.
- DABOUSSI, M-J; LANGIN, T; BRYGOO, Y. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. **Molecular and General Genetics**, v. 232, p. 12-16, 1992.
- DI STEFANO, L. All quiet on the TE front? The role of chromatin in transposable element silencing. **Cells**, v. 11, n. 16, p. 2501, 2022.
- DOBINSON, K.F.; HARRIS, R. E.; HAMER, J. E. *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 114-114, 1993.
- FAO. *FAOSTAT: Food and Agriculture Data*. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 31 mar. 2025.
- FARMAN, M. L. et al. *MAGGY*, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, v. 251, p. 665-674, 1996.
- FERST, L. M. Tales from a genome heavily affected by rip: unraveling *Tc1/mariner* and *Mite* transposable elements in *Colletotrichum lindemuthianum*. 2023. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2022.
- FIRON, A. et al. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 247-255, 2003.
- FOUCHÉ, S. et al. Stress-driven transposable element de-repression dynamics and virulence evolution in a fungal pathogen. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 1, p. 221-239, 2020.
- FULCI, V.; MACINO, G. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 199-203, 2007.
- GANASCINI, D. et al. Analysis of the production chain of bean culture in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 256-67, 2019.

- GUPTA, C.; SALGOTRA, R. K.; VENEGAS, R. A. SNP-based functional marker for anthracnose-resistant *Co-2* gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 132, n. 2, p. 66, 2025.
- HEILIG, J. S.; ELBING, K. L.; BRENT, R. Large-scale preparations of plasmid DNA. **Current Protocols in Molecular Biology**, v.1, n.1, p. 1.7.1 – 1.7.16, 1998.
- HOI, J. W. S. et al. Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 68-82, 2007.
- HUA-VAN, A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M-J. Evolutionary history of the *Impala* transposon in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 10, p. 1959-1969, 2001.
- KACHAPULULA, J. S. et al. Quantitative Trait Loci Analysis for Anthracnose Resistance in a Population Derived From Andean Varieties Bukoba and Kijivu of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, 2025.
- KACHROO, P.; LEONG, S. A.; CHATTOO, B. B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, v. 245, p. 339-348, 1994.
- KITO, H. et al. *Occan*, a novel transposon in the *Fot1* family, is ubiquitously found in several *Magnaporthe grisea* isolates. **Current Genetics**, v. 42, p. 322-331, 2003.
- LATUNDE-DADA, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 187-198, 2001.
- LAX, C. et al. The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9348, 2020.
- LU, F. et al. *Minos* and *Restless* transposon insertion mutagenesis of psychrotrophic fungus for red pigment synthesis adaptive to normal temperature. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, p. 118, 2022.
- MAHMOUD, G. A-E. Biotic stress to legumes: fungal diseases as major biotic stress factor. In GULERIA, P.; KUMAR, V., LICHTFOUSE, E. (Org.). **Legume Agriculture and Biotechnology Vol 2**. Cham: Springer, 2021. p. 181-212, 2021.
- MAGALHÃES, R.F. Caracterização funcional das proteínas Dicer-like em *Colletotrichum lindemuthianum*. 2022. 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022.
- MESQUITA, F. R. et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007.
- NABI, A. et al. Optimizing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation conditions in *Colletotrichum lindemuthianum*: a step forward to unravel the functions of pathogenicity arsenals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 293-307, 2022.

NABI, N. et al. Pathogenically altered *Colletotrichum lindemuthianum* transformants help in understanding the biochemical defense and colonization dynamics in *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 129, p. 102208, 2024.

NABI, A. et al. *Phaseolus vulgaris*-*Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem in the post-genomic era: An update. **Current Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 36, 2022.

NICOLÁS, F. E.; GARRE, Victoriano. RNA interference in fungi: retention and loss. In: HEITMAN, J; HOWLETT, B. J.; CROUS, P. W.; STUKENBROCK, E. H.; JAMES, T. Y.; GOW, N. A. R. (Org.). **The Fungal Kingdom**. Washington, DC: ASM press, 2017. p. 491-506.

NOGUEIRA, G. B. et al. The histidine kinase *slnC11* of *Colletotrichum lindemuthianum* as a pathogenicity factor against *Phaseolus vulgaris* L. **Microbiological Research**, v. 219, p. 110-122, 2019.

NUNES, M. P. B. A. et al. Relationship of *Colletotrichum lindemuthianum* races and resistance loci in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. **Crop Science**, v. 61, n. 6, p. 3877-3893, 2021.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75-98, 1985.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A. Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. In: MENDGEN, K.; LESEMANN, D. E. (ed.). **Electron microscopy of plant pathogens**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. p. 211-222.

OGASAWARA, H. et al. *Crawler*, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6-7, p. 441-449, 2009.

OKUDA, M. et al. *Tfo1*: an Ac-like transposon from the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular and General Genetics**, v. 258, p. 599-607, 1998.

PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n.2, p. 317-330, 2017.

PELLIER, A-L. et al. *CLNRI*, the *AREA/NIT2*-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-655, 2003.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R.; O'CONNELL, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 813-819, 2001.

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

QUEIROZ, C. B. et al. Draft genome sequences of two isolates of *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in common beans. **Genome Announcements**, v. 5, n. 18, p. 214-217, 2017.

REP, M.; VAN DER DOES, H. C.; CORNELISSEN, B. J. C. *Drifter*, a novel, low copy *hAT*-like transposon in *Fusarium oxysporum* is activated during starvation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 6, p. 546-553, 2005.

ROSA, R. O. Estabelecimento de sistemas de transformação baseados em auxotrofia para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022.

RAHE, J. E. et al. Correlation of phenolic metabolism with histological changes in *Phaseolus vulgaris* inoculated with fungi. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 75, p. 58-71, 1969.

SCHWARTZ, H. F.; CORRALES, M. P. (ed.). **Beans Production Problems in the Tropics**. CIAT, 1989.

SHARMA, P. N. et al. Yield loss assessment in common bean due to anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) under sub temperate conditions of North-Western Himalayas. **Indian Phytopathology**, v. 61, n. 3, p. 323, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning-Sambrook & Russel-Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harbor Lab Press: Long Island, NY, USA**, 2001.

SILVA, L. L. da et al. Use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for the inactivation of pectinase genes in *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, p. 1-14, 2021.

SILVA, L. L. da et al. What lies behind the large genome of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 5, p. 1459229, 2024.

SOARES, M. A. et al. *PacCl*, a pH-responsive transcriptional regulator, is essential in the pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum*, a causal agent of anthracnose in bean plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, p. 769-785, 2014.

SPECHT, C. A. et al. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.

TROUVELOT, S. et al. Recovery of *Fusarium oxysporum* Fo47 mutants affected in their biocontrol activity after transposition of the *Fot1* element. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 936-945, 2002.

WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

YAN, Y. et al. *Colletotrichum higginsianum* as a model for understanding host–pathogen interactions: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2142, 2018.

CAPÍTULO 2

Transposição do elemento *Impala* em *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose em soja

RESUMO

A soja é uma *commodity* muito versátil, amplamente utilizada em muitos processos industriais, especialmente na alimentação, por causa do alto valor nutricional. Uma elevada demanda pelo grão exige a manutenção de uma boa produtividade. A antracnose, doença causada pelo ascomiceto *Colletotrichum truncatum*, tem se tornado um grande fator limitante para a produção de soja. O controle do *C. truncatum* é feito majoritariamente por fungicidas, mas, a variabilidade genética apresentada pelo patógeno permite a sua adaptação e consequente diminuição da eficiência do controle químico. Nesse contexto, é importante que os mecanismos moleculares de patogênese desse fungo sejam compreendidos, visando a descoberta de alvos para o controle da doença. Muitos processos biológicos importantes, como a patogenicidade, são compreendidos estudando a função de genes individuais. Assim, esse trabalho teve como objetivo introduzir em *C. truncatum* e avaliar a transposição de *Impala*, um elemento da Classe II, da superfamília *Tc1/Mariner* de *Fusarium oxysporum*, visando ao desenvolvimento de um sistema de mutagênese insercional aleatória. Para isso, foi isolado um mutante para a nitrato redutase, que foi usado como linhagem receptora em um ensaio fenotípico baseado na restauração da atividade da enzima nitrato redutase pela excisão de uma cópia de *Impala*. Foram isoladas duas linhagens (T2 e T3) contendo duas e três cópias do *Impala* (*niaD::Impala*) integradas em posições diferentes, respectivamente. Os ensaios para transposição de *Impala* realizados em meio mínimo com nitrato permitiram o isolamento de 43 colônias revertentes para a linhagem T2 e 1124 para a linhagem T3. A análise por meio de Southern Blot confirmou a transposição de *Impala* em *C. truncatum* nos revertentes analisados. Este estudo mostrou pela primeira vez a transposição heteróloga de *Impala* em *C. truncatum* e o seu potencial para utilização em ensaios de mutagênese insercional nesse fitopatógeno. As análises por meio de PCR e Southern Blot confirmaram a transposição de *Impala* nos revertentes de *C. truncatum* avaliados. *Impala* transpôs em uma taxa de $74,9/10^6$ conídios no transformante T3 e $2,9/10^6$ conídios no transformante T2. O resultado da hibridização revelou que o elemento reinsereiu em uma nova posição genômica em 43% dos revertentes analisados. Uma biblioteca de revertentes com possíveis inserções aleatórias de *Impala* foi criada e será triada futuramente quanto a patogenicidade. Descrevemos aqui uma estratégia de manipulação genética que não depende de uma alta eficiência de transformação, capaz de gerar um grande número de candidatos a mutantes em uma única etapa. Esse conhecimento pode ser útil para alavancar estudos de genômica funcional em *C. truncatum* futuramente.

Palavras-chave: Transposon. Genômica funcional. Mutagênese Insercional.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é um produto agrícola essencial, valorizado pelo seu alto valor nutricional e por suas diversas aplicações na indústria alimentícia, tanto na nutrição humana (Qin et al., 2022) quanto animal (Gaffield et al., 2024; Stein et al., 2008), além de ser utilizada em outros processos industriais, como na produção de biodiesel (Kawamura et al., 2025) e de plásticos biodegradáveis (Yamada et al., 2020). Por ser uma *commodity* extremamente versátil, a soja possui uma grande demanda no mercado, o que exige uma produção em larga escala. Em 2023, a produção global ultrapassou 350 milhões de toneladas, sendo 84,2% concentradas nas Américas, com o Brasil liderando o ranking de produção e exportação do grão (FAOSTAT, 2023).

As doenças causadas por fitopatógenos afetam a produtividade da soja. A antracnose, especificamente, tem se tornado uma ameaça à produção, acarretando em perdas excessivas de rendimento, principalmente na América do Sul, onde existe uma vasta área de cultivo (Dias et al., 2019). Uma incidência tão baixa quanto 1% desta doença pode causar uma redução de até 90 kg/há (Dias et al., 2016). Os sintomas da antracnose podem afetar a soja em qualquer estágio fenológico e incluem manchas escurecidas e deprimidas nas vagens, pecíolos e caules. As folhas podem apresentar nervuras laminares necróticas, levando à desfolha prematura. Quando o patógeno infecta a semente, pode provocar lesões nos cotilédones e tombamento tanto pré-emergência quanto pós-emergência (Bouffleur et al., 2021)

O ascomiceto *Colletorichum truncatum* (Schwein.) Andrus & WD Moore é a principal espécie associada a antracnose na soja. O seu ciclo de vida é hemibiotrófico, caracterizado por um estágio inicial de biotrofia, quando ocorre germinação do conídio, formação do apressório, e a penetração na parede celular por meio de hifas especializadas, seguida da formação das vesículas de infecção, de onde emergem as hifas primárias. Depois, o fungo passa para o estágio necrotrófico, associado ao surgimento das hifas secundárias, que secretam enzimas hidrolíticas, responsáveis pela maceração do tecido vegetal. Nesta segunda etapa, os sintomas se tornam visíveis (Bhadauria et al., 2013).

No Brasil, o controle químico é utilizado como estratégia predominante para o manejo da antracnose, uma vez que não há cultivares altamente resistentes ao patógeno (Billore et al., 2011; Dias et al., 2016; Mello et al., 2024). Entretanto, a alta variabilidade genética apresentada por *C. truncatum* (Dias et al., 2019) permite a sua adaptação a diferentes condições ambientais, o que contribui para a diminuição da sensibilidade a fungicidas e dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes (Shi et al., 2025). Assim, é essencial esclarecer o mecanismo molecular

de patogenicidade em *C. truncatum*, pois esse conhecimento permite a descoberta de alvos para o controle do fitopatógeno (Lu et al., 2022).

As novas tecnologias de sequenciamento têm impulsionado o entendimento da interação planta-patógeno (Campos et al., 2021a; Campos et al., 2021b). No entanto, é crucial que esse progresso seja acompanhado por abordagens que permitam analisar qual o papel dos genes na patogenicidade, e o desenvolvimento de técnicas de alto rendimento que permitam descobrir e entender funções genéticas continua sendo um desafio para a biologia molecular (Langridge et al., 2009; Idnurm et al., 2017). Esforços já foram feitos para anotação do genoma de *C. truncatum* (Rogério et al., 2020), bem como para elucidação de efetores candidatos (Rao & Nandineni; 2001; Bhadauria et al., 2013); e dos fatores que influenciam a arquitetura e evolução do genoma (Rao et al., 2018). Contudo, ainda há uma carência de estudos de genômica funcional nesta espécie, o que pode ser reflexo da falta de estratégias eficazes.

A mutagênese empregando transposon tem sido utilizada com sucesso para elucidar genes de virulência em muitos organismos, combinando mutagênese insercional aleatória com triagem fenotípica (Niu et al., 2025; Gao et al., 2025; Maul et al., 2025). Transposons são elementos genéticos que possuem a capacidade de automobilização dentro do genoma (Wicker et al., 2007). Ao se mover de uma região para outra, o elemento transponível pode se inserir em um gene, levando a sua inativação. A sequência do transposon marca o gene afetado, permitindo a sua identificação (Van e Levin, 2020). Existem muitas maneiras de classificar esses elementos, a mais comum leva em consideração o mecanismo de mobilização no genoma. Assim, eles são divididos em classes, os elementos da Classe I são transcritos em RNA e transcritos reversamente em DNA, por isso são chamados de retrotransposons. Os elementos da Classe II transpõem diretamente como DNA, pela sua excisão e reinserção em um novo sítio, ou pela mobilização de uma das fitas (Fabrício et al., 2013; Hassan et al., 2024). Eles também são classificados como autônomos quando possuem todos os componentes necessários para a sua mobilização (Wicker et al., 2007). Os transposons da Classe II são mais vantajosos para mutagênese insercional porque a transposição da grande maioria dos elementos não envolve o aumento do número de cópias (Chow et al., 2024). Além disso, o seu tamanho reduzido facilita a sua manipulação e recuperação do gene inativado (Pereira et al., 2003).

Estudos anteriores demonstraram a transposição heteróloga eficiente de *Impala* em *Magnaphorte grisea* (Villaba et al., 2001), *Penicillium griseoroseum* (Queiroz e Daboussi, 2003), *Aspergillus nidulans* (Li Destri Nicosia et al., 2001), *Aspergillus fumigatus* (Firon et al., 2003) e *Geomyces* sp. WNF-15A (Ding et al., 2022). *Impala* é um elemento da Classe II,

pertencente a superfamília *Tc1/Mariner*, que possui 1280 pb e codifica uma transposase de 340 aminoácidos. A região codificadora é flanqueada por sequências terminais invertidas (TIRs) de 37 pb. A transposase codificada por *Impala* reconhece as suas TIRs e catalisa a excisão e reinserção do elemento em um novo local no genoma (Daboussi e Langin, 1994; Huan-Van et al., 1998). Sistemas usando *Impala* geralmente são empregados com o elemento inserido a montante do gene que codifica a enzima nitrato redutase, *niaD*. A transposição restaura a atividade da nitrato redutase fazendo com que o fungo seja capaz de crescer em meio mínimo com nitrato (Villalba et al., 2001). Isso possibilita a obtenção de múltiplos mutantes insercionais em um único experimento, pelo simples plaqueamento em meio mínimo contendo nitrato.

O sucesso da aplicação de *Impala* em estudos de genômica funcional em outros fungos nos levou a analisar a sua atividade *in vivo* em *Colletotrichum truncatum*. Assim, este trabalho teve como objetivo testar a transposição heteróloga de *Impala* neste fitopatógeno, para desenvolver um sistema de mutagênese insercional baseado em transposon para esta espécie. Para isso, foi isolado um mutante para a nitrato redutase, usado como linhagem receptora nos ensaios de excisão fenotípica. Aqui, mostramos pela primeira vez a transposição *heteróloga* em *C. truncatum*. Mostramos que *Impala* transpõe eficientemente, por meio de análises moleculares de excisão e reinserção, o que possibilitou a construção de uma coleção de linhagens revertentes com possíveis inserções aleatórias de *Impala*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos com a cepa CT49 de *C. truncatum*, pertencente ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados foram preservados pelo método de Castellani (1939).

A cepa CT49 e seus derivados foram cultivados em placas contendo meio esporulante YMC (extrato de malte 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 2 g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹) a 25°C. Para a obtenção de micélio, uma suspensão de conídios (1×10⁶ conídios/mL) foi colocada em meio GPYECH (glicose 20 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, caseína hidrolisada 1 g.L⁻¹) e incubada sob agitação a 180 rpm, a 25°C, por um período de 3 a 5 dias.

2.2 Obtenção de mutantes Nit1⁻ resistentes ao clorato

Linhagens defectivas para o gene que codifica a enzima nitrato redutase foram obtidas pelo método de seleção positiva via resistência ao clorato, conforme descrito por Pereira et al. (2003). Uma suspensão de 1×10^6 conídios do isolado CT49 foi inoculada pelo método *pour plate* em 10 placas de Petri contendo meio mínimo (MM, Pontecorvo et al., 1953) sem nitrato (fosfato de potássio monobásico $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, cloreto de potássio $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de magnésio $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato ferroso $0,01 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de zinco $0,01 \text{ g.L}^{-1}$, glicose 20 g.L^{-1} , ágar 15 g.L^{-1}), suplementado com glutamato de sódio (10 mM) e clorato de potássio (470 mM). As placas foram incubadas a 25°C até o aparecimento de colônias resistentes ao clorato.

As colônias resistentes foram transferidas para meio completo (MM suplementado com peptona 2 g.L^{-1} , caseína hidrolisada $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, extrato de levedura 2 g.L^{-1} e solução de vitaminas [biotina 0,2 mg, ácido p-aminobenzoico 10 mg, piridoxina 50 mg, tiamina 50 mg, ácido nicotínico 100 mg, riboflavina 100 mg, água destilada 100 mL] na concentração de 1 mL.L^{-1}), ajustado para pH 6,8, seguido de purificação monospórica.

A caracterização dos mutantes foi realizada pela inoculação das colônias resistentes em placas de Petri contendo MM suplementado com diferentes fontes de nitrogênio: 10 mM de nitrato de sódio, de cloreto de amônio e de hipoxantina, e 5 mM de nitrito de sódio. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Os resultados foram analisados usando a classificação fenotípica descrita por Cove (1976).

2.3 Caracterização molecular dos mutantes Nit1⁻

A caracterização molecular foi feita por meio de Southern Blot, seguindo as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001). O DNA total dos mutantes foi extraído conforme descrito por Specht et al. (1982). Aliquotas de 5 μg de DNA foram digeridos com a enzima de restrição *AccI*. A sonda foi construída com o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science), utilizando os primers nit1CTF (5'-AAGGTGCCGACAAACTGCCT-3') e nit1CTR (5'-CTCCTTGGCGGGTTCTTGCT-3'). A hibridização e detecção foram feitas com o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Applied Science), seguindo as recomendações do fabricante.

2.4 Plasmídeos

No experimento de co-transformação foram utilizados os plasmídeos pAN7.1 (Punt et al., 1987) e pNIL160 (Villalba et al., 2001b). O plasmídeo pAN7.1, utilizado como marcador de seleção dos transformantes, contém o gene da higromicina B fosfotransferase de *Escherichia coli* sob o controle do promotor do gene *gpd* e do terminador do gene *trpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*. O plasmídeo pNIL160 apresenta um fragmento clonado no vetor pUC19, contendo uma cópia do elemento *Imp160*, derivado de *Fusarium oxysporum*, inserida no promotor do gene *niaD* de *A. nidulans*. Os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α , por meio de choque térmico de acordo com Sambrook e Russel (2001). A extração dos plasmídeos foi feita por meio de lise alcalina, conforme descrito por Heilig et al. (1998) e o armazenamento foi feito em água ultrapura estéril a -20°C .

2.5 Co-transformação genética

A transformação genética foi realizada a partir de protoplastos, utilizando PEG/ CaCl_2 , conforme descrito por Soares et al. (2014), com algumas modificações. A preparação dos protoplastos envolveu o tratamento de 0,8 a 1 g de micélio fúngico com 10 mL de KCl 0,8M em tampão fosfato 10 mM (pH 5,8) e 15 mg/mL de Lysing Enzyme (Sigma), com incubação a 32°C , 80 rpm, por até 3 horas. Os protoplastos foram separados do micélio por filtração utilizando seringas com gaze estéril e, em seguida, lavados três vezes por centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 10 mL de solução ST (Sorbitol 1M, Tris HCl 0,01M), e a terceira com 5 mL de solução STC (ST suplementado com 0,05 M de CaCl_2). Os protoplastos foram ressuspensos em STC em uma concentração de 1×10^6 protoplastos/mL. Para a co-transformação, foram utilizados 5 μg de DNA de cada plasmídeo, 200 μL da suspensão de protoplastos e 50 μL de polietilenoglicol 6000 60%, com 50 mM de CaCl_2 . A mistura foi colocada em gelo por 20 minutos e foram adicionados 500 μL da mesma solução de polietilenoglicol, e a mistura foi depositada à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 750 μL de STC para completar o volume para 1,5 mL. A regeneração dos protoplastos foi feita em meio BDA contendo sacarose (0,56 M) como estabilizador osmótico e incubada a 22°C . Após 48 horas de incubação, foi adicionado 10 mL de BDA contendo higromicina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em cada placa. Os transformantes resistentes a higromicina foram transferidos para um novo meio de cultura

contendo a mesma concentração do antibiótico e, posteriormente, foi realizada a purificação monospórica. Os transformantes estáveis foram preservados pelo método de Castellani (1939).

2.6 Isolamento de colônias revertentes

Uma suspensão de 1×10^6 conídios/mL foi inoculada pelo método *pour plate* em placas de Petri contendo meio mínimo CZAPEK-DOX. Para cada co-transformante, foram utilizadas 15 placas, que foram incubadas a 25°C até o surgimento de colônias com crescimento vigoroso. Após o período de incubação, as linhagens revertentes foram transferidas para novas placas contendo meio mínimo CZAPEK-DOX, e, em seguida, foi realizada a purificação monospórica (Queiroz e Daboussi, 2003). As colônias revertentes foram armazenadas em placas de 48 poços contendo meio BDA, a 4°C.

2.7 Caracterização molecular dos co-transformantes

Os primers SPE5 (5'-AGAACACAACCCTGCCACGG-3') e SPE3 (5'-TCCGGGCCGTATGCACAGAG-3'), que amplificam 573 pb da região codificadora da transposase do *Impala*, foram utilizados para verificar quais linhagens resistentes a higromicina receberam o plasmídeo pNIL160. Foi realizada uma extração rápida, por meio da maceração de um disco de micélio em 500 μ L do tampão de extração (SDS 0,2%, EDTA 50 mM), seguida de incubação a 65°C por 30 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e 0,5 volumes de acetato de amônio 7,5M e 1,5 volumes de isopropanol foram adicionados. A amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. Os pellets formados foram lavados com etanol 70% e ressuspensos em água ultrapura estéril. Uma alíquota de 1 μ L de DNA foi usada para a PCR tradicional, em uma reação de 25 μ L, contendo 1 μ L da enzima Taq DNA polimerase (Cellco, São Paulo, Brasil). O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida por 33 ciclos de: 95°C por 20 s, 57°C por 20 s, 72°C por 1 min e 40 s, com extensão final 72°C por 2 minutos.

Os transformantes confirmados por PCR foram selecionados para a caracterização molecular por Southern Blot, seguindo as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001). O DNA total foi extraído dos transformantes conforme descrito por Specht et al. (1982) e alíquotas de 5 μ g de DNA foram digeridas com a enzima *ApaI*, que cliva o plasmídeo pNIL160 em um único sítio, sem clivar *Impala*. A sonda foi construída com o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science), usando os primers SPE5 e SPE3. A hibridização e detecção

foram feitas com o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Applied Science), seguindo as recomendações do fabricante

2.8 Caracterização molecular das linhagens revertentes

A confirmação de que a reversão do fenótipo Nit1⁻ para Nit1⁺ resultava da excisão do transposon foi realizada por PCR, utilizando os primers e niaD144 (5'-GTTCATGCCGTGGTCGCTGCG-3') e niaDAN2 (5'-CGGATGGTGATATCGGGGTG-3'). Uma alíquota de 1uL foi usada para PCR tradicional, em uma reação de 25 uL, contendo 1 uL da enzima Taq DNA polimerase (Cellco, São Paulo, Brasil) e 4 mM de MgCl₂. O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida por 33 ciclos de: 95°C por 20 s, 62°C por 20 s, 72°C por 4 min, com extensão final 72°C por 2 minutos. O amplicon de 3745 pb corresponde ao *niaD* interrompido pelo *Impala*, enquanto o amplicon de 2465 pb indica a ausência do transposon na região promotora do gene.

Foi realizada a análise da transposição e reinserção de *Impala* nos revertentes por meio de Southern Blot conforme descrito no item 2.7.

2.9 Análise de sequências

O genoma de referência de *Colletotrichum truncatum*, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o número de acesso GCF_014235925.2, foi utilizado para identificação do gene que codifica a enzima nitrato redutase. Os domínios da enzima nitrato redutase, número de acesso XP_036575760.1, foram preditos usando o software InterprotScan (Jones et al., 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento e caracterização de um mutante *nit1* estável

Neste estudo foram obtidos 85 mutantes resistentes ao clorato, provenientes do isolado CT49. A caracterização desses mutantes quanto ao tipo de mutação na via de assimilação do nitrato foi feita por meio de ensaios de crescimento em meio mínimo contendo diferentes fontes de nitrogênio. Os resultados estão organizados no Apêndice A e demonstram que a maioria dos mutantes (n = 48) possuem uma mutação no gene que codifica a enzima nitrato redutase (*nit1*). A perda de função do gene *nit1*, assim denominado para *C. truncatum*, pode acontecer devido

a mutações pontuais, deleções e inserções acarretadas por elementos transponíveis. Deste modo, foi conduzida a caracterização molecular dos mutantes por Southern Blot.

Uma busca realizada no genoma de referência de *C. truncatum*, disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), indicou 3 sequências como nitrato redutases putativas. Entretanto, apenas uma delas codifica uma proteína que apresenta todos os domínios funcionais característicos dessa enzima: um cofator de pterina contendo molibdênio (MoCo), o citocromo b (heme) e o FAD. A nitrato redutase é uma enzima mutliredox, que funciona como um dímero, catalisando a redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), de modo que dois elétrons do NAD(P)H são transferidos para o nitrato por meio dos domínios FAD, heme e MoCo (Garde et al., 1995). Isso sugere que *C. truncatum* possui apenas um gene que codifica a enzima nitrato redutase, enquanto as outras sequências foram erroneamente associadas a essa enzima. Esta sequência foi, então, utilizada para construção da sonda usada na etapa de hibridização

Cinco mutantes foram selecionados aleatoriamente para caracterização molecular. A Figura 1A mostra o resultado da hibridização. O DNA total foi clivado com a enzima *AccI* e hibridizado com uma sonda que corresponde a parte da região codificadora do gene *nit1* (Figura 1B). A cepa selvagem, CTWT, apresentou os dois fragmentos esperados, um com 2670 pb e outro com 976 pb. Os mutantes Nit1-CT39, Nit1-CT23, Nit1-CT06 e Nit1-CT03 apresentaram o mesmo perfil de hibridização que a cepa selvagem, o que indica que a inativação do gene *nit1* provavelmente é ocasionada por uma substituição de bases, podendo ser uma transição ou uma transversão. A ausência da banda de 2670 pb no mutante Nit1-CT10 sugere que a região de homologia com a sonda foi perdida neste isolado. Assim, é possível inferir que parte do gene foi deletado, levando a sua inativação. Nenhum dos mutantes apresentaram bandas maiores que o tamanho esperado, isso indica que em nenhum deles houve inserção dentro do *nit1*. Todos os mutantes obtidos foram testados quanto a capacidade de reversão da mutação. Quando crescidos em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, os mutantes não apresentaram colônias de crescimento vigoroso, o que sugere que eles apresentam taxa de reversão muito reduzida ou nula. O mutante Nit1-CT10 foi escolhido para prosseguir com os experimentos deste trabalho devido à deleção no gene *nit1*.

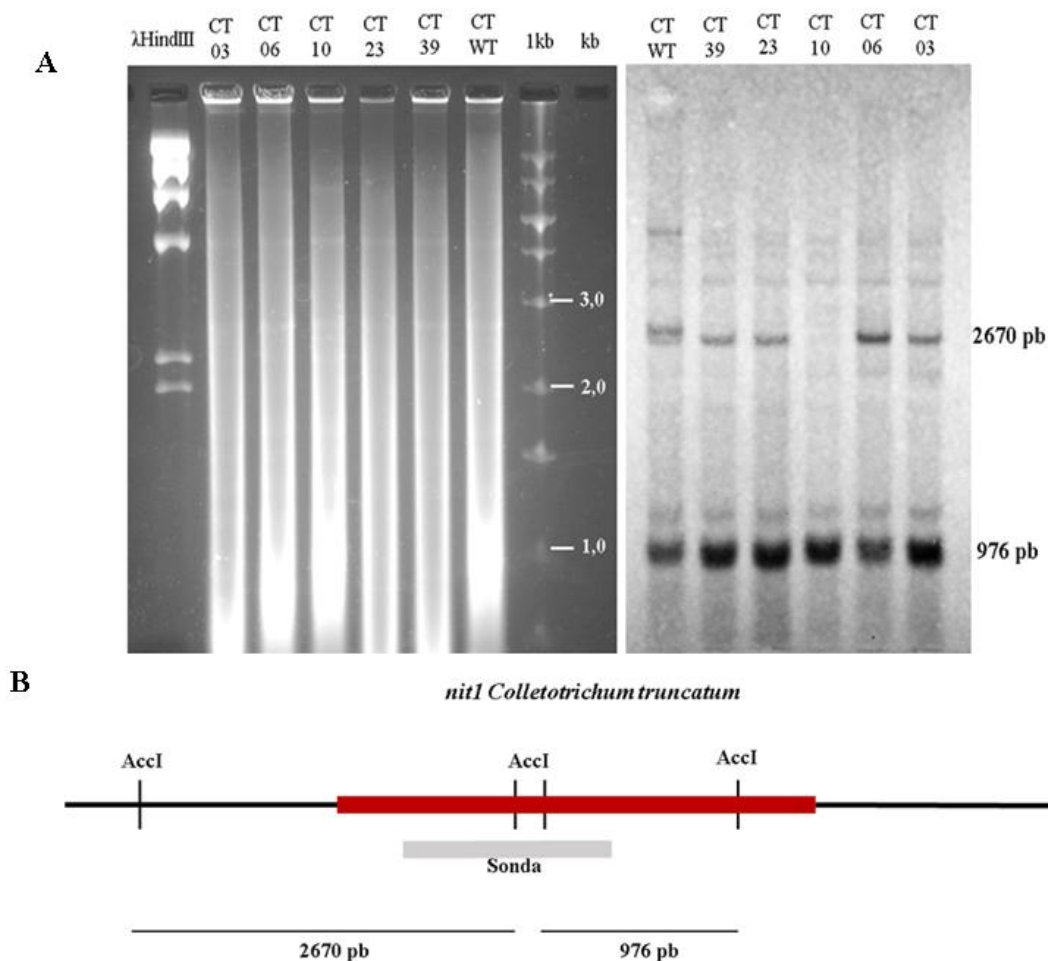


Figura 1. Caracterização molecular dos mutantes defectivos para a enzima nitrato redutase de *Colletotrichum truncatum* por Southern Blot. (A) DNA total dos mutantes Nit1⁻ (CT03, CT06, CT10, CT23 e CT39) e do selvagem (CTWT) foram digeridos com a enzima de restrição *AccI* e separado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com um fragmento de 917 pb. (B) Mapa de restrição da enzima *AccI* para o gene *nit1* de *C. truncatum*. Como sonda foi utilizado um fragmento de 917 pb correspondente a parte da região codificadora do *nit1*, representada em vermelho na figura. A sonda apresenta uma região de homologia de 438 pb com o fragmento maior e 357 pb com o menor.

3.2 *Impala* é capaz de transpor no genoma de *C. truncatum*

A fim de determinar se o *Impala* é capaz de transpor no genoma de *C. truncatum*, foi utilizada a mesma abordagem descrita anteriormente para o *Impala* em *M. grisea*. O plasmídeo pNIL160, que contém *niaD::Impala*, foi introduzido no mutante Nit1⁻CT10, defectivo para o

gene que codifica a enzima nitrato redutase. Como pNIL160 não possui marca de seleção, foi feita uma co-transformação com o plasmídeo pAN7.1, que carrega o gene da higromicina B fosfotransferase (*hph*).

Sete transformantes resistentes a higromicina foram selecionados em meio BDA contendo 250 ug/mL do antibiótico. Todos eles se desenvolveram ao passarem por novos meios seletivos, revelando a capacidade do fungo de integrar o DNA exógeno de forma estável no genoma. Cinco transformantes HygR foram selecionadas para análise por PCR, para determinar se eles haviam recebido também o plasmídeo pNIL160. Foram utilizados primers que amplificam parte da região codificadora da transposase do elemento *Impala*. A análise dos produtos da PCR revelou que 3 transformantes apresentavam o plasmídeo pNIL160 (Figura 2A). Dois transformantes, T3 e T2, foram analisados por Southern Blot para verificar o número de integrações do plasmídeo pNIL160. O DNA foi digerido com uma enzima de restrição que cliva o plasmídeo em um único sítio, de modo que cada banda observada na Figura 2B representa uma integração do pNIL160. Essa análise revelou que o isolado T3 possui 3 integrações, enquanto o isolado T2 apresenta apenas duas. A ausência de bandas para o mutante Nit1-CT10 demonstra que *C. truncatum* não possui cópias endógenas do *Impala*.

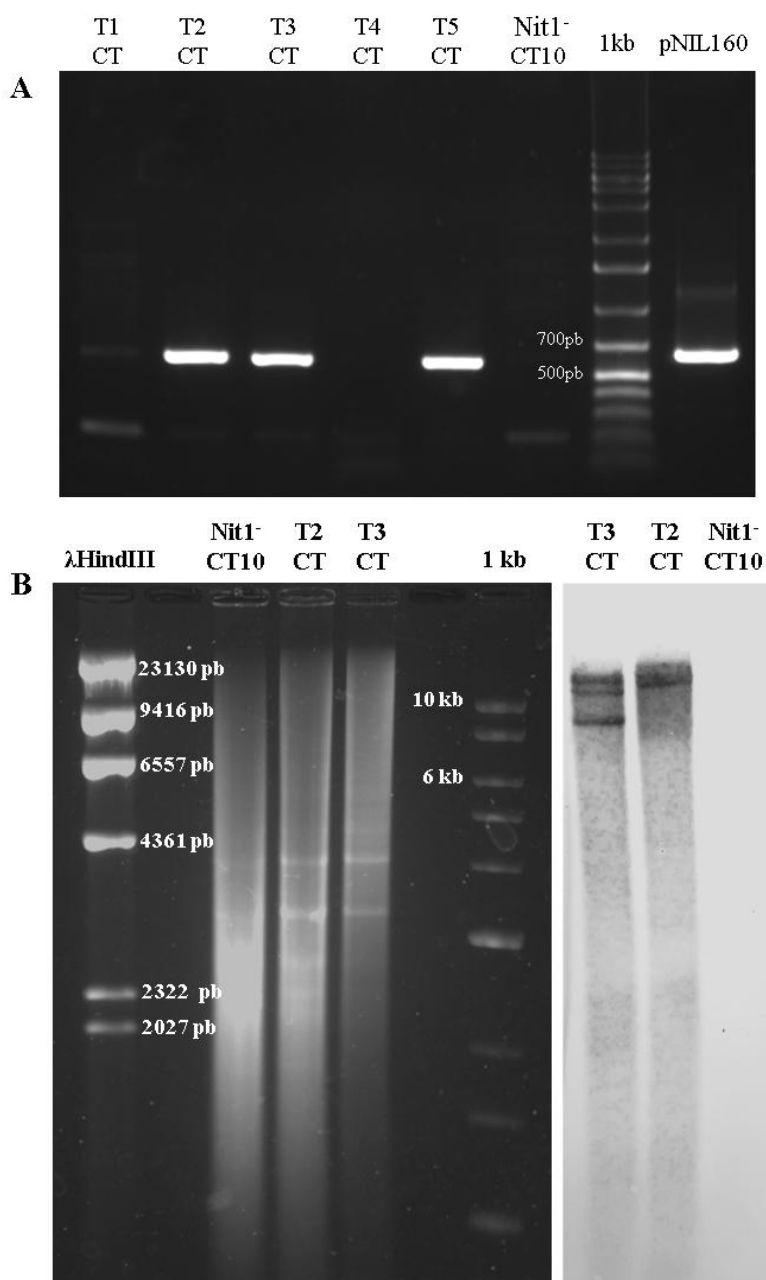


Figura 2. Análise da presença do plasmídeo pNIL160 em transformantes resistentes a higromicina. (A) O amplicon de 573 pb corresponde a parte da região codificadora da transposase do *Impala*. T: transformante. 1kb: Marcador. Nit1-CT10: controle negativo da reação de PCR. pNIL160: controle positivo da reação de PCR. (B) Caracterização molecular dos transformantes T3 e T2 confirmados por PCR. O DNA total foi clivado com a enzima de restrição *ApaI* e hibridizado com uma sonda de 573 pb.

Os isolados T3 e T2 foram submetidos ao ensaio de excisão fenotípica para verificar se o *Impala* é capaz de transposição do gene *niaD*. Este ensaio é baseado na complementação da

mutação do gene *nit1* pela restauração da funcionalidade do gene *niaD*, acarretada pela excisão de *Impala*. O evento de excisão é identificado pela observação de colônias de crescimento vigoroso (revertentes) em MM +N (nitrato), sobre um fundo de micélio esparso (mutantes) (Figura 3A).

O isolado T3 apresentou um total de 1124 colônias revertentes, o que representa uma taxa de excisão de 74,9 por 10^6 esporos plaqueados. No mesmo tempo de incubação, o isolado T2 apresentou 43 colônias revertentes, representando uma taxa de excisão de 2,9 por 10^6 esporos. A taxa de excisão é calculada a partir do número de colônias capazes de metabolizar o nitrato que surgem em placas inoculadas com um número fixo de conídios. O mutante Nit1-CT10 não apresentou nenhuma colônia de crescimento vigoroso (Figura 3B), o que reforça que a restauração do fenótipo *NiaD*⁻ para *NiaD*⁺ é resultado da transposição do *Impala* e não da reversão da mutação no gene *nit1* de *C. truncatum*.

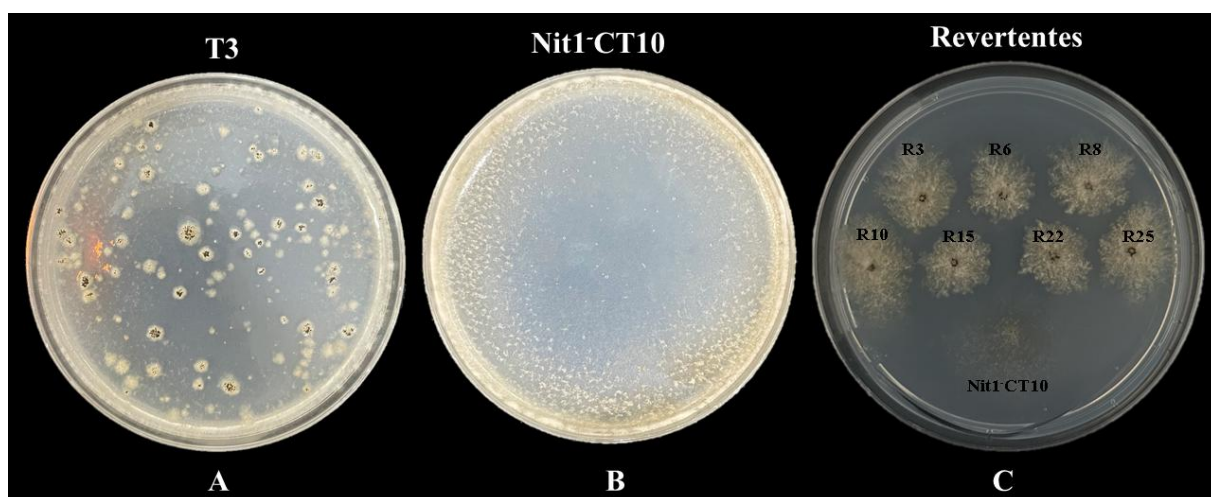


Figura 3. Ensaio de reversão da mutação *niaD::Impala* em *Colletotrichum truncatum*. (A) Crescimento em MM + N (nitrato) de colônias com o fenótipo *NiaD*⁺ restaurado pela excisão do *Impala*. (B) Ausência de crescimento vigoroso do isolado Nit1-CT10 em MM + N. (C) Crescimento dos revertentes R3, R6, R8, R10, R22, R25 e Nit1-CT10 em MM + N.

A análise por PCR de sete revertentes derivados do isolado T3 mostrou que todos apresentaram um amplicon de 2645 pb, que representa o gene *niaD* sem *Impala*, indicando a excisão do elemento. Em contraste, o transformante T3 ainda manteve o *niaD* interrompido pelo transposon, evidenciado pelo amplicon de 3745 pb (Figura 4). O fenótipo desses revertentes em MM + N é comparado ao do mutante Nit1-CT10 na Figura 3C. A capacidade do transposon de excisar e reinsere em um novo local foi avaliada pela hibridização do DNA dos

revertentes com o *Impala* como sonda. Essa análise mostrou que 3 dos 7 revertentes, R25, R15 e R3, apresentaram uma cópia do *Impala* reinserido em um novo sítio (Figura 5). Entretanto, a presença de *background* e bandas de baixa intensidade na membrana dificultou a análise precisa do perfil de reinserção do transposon. Portanto, não é possível afirmar que o elemento foi perdido naqueles revertentes que não apresentaram bandas na membrana, tendo em vista que seja pouco provável que todas as 3 cópias do transposon tenham excisado e não integrado em um novo sítio. O perfil de Southern Blot observado pode ter sido ocasionado por degradação de parte do DNA ou problemas nas condições de pré-hibridização ou nas lavagens pós-hibridização.

A partir do ensaio de excisão fenotípica, foi construída uma biblioteca com 300 mutantes insercionais de *C. truncatum*. Esses mutantes serão testados quanto a patogenicidade futuramente, com intuito de elucidar genes importantes no processo de infecção do hospedeiro.

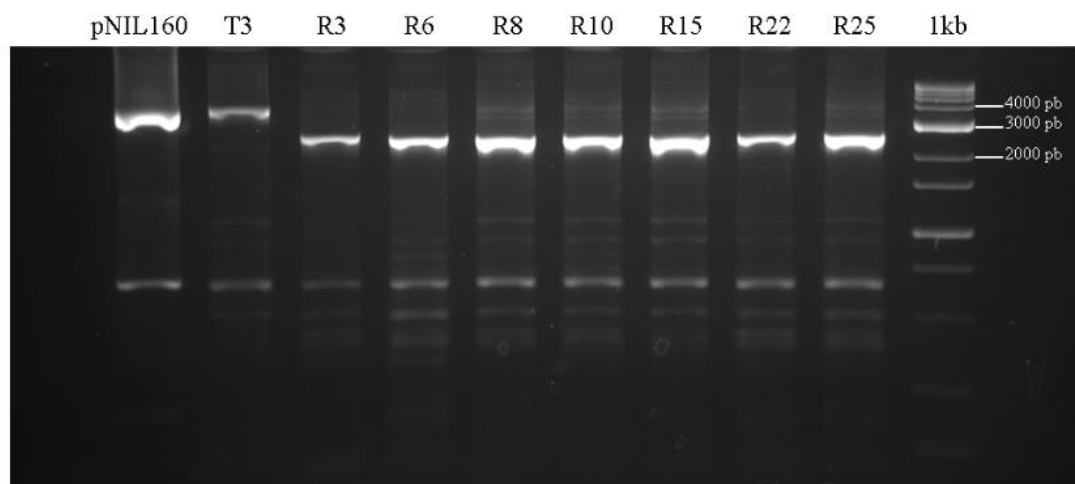


Figura 4. Amplicons derivados da PCR de confirmação da excisão de *Impala*. Os amplicons de 3745 pb correspondem ao *niaD::Impala*, enquanto os amplicons de 2645 pb correspondem a região promotora do *niaD* sem o transposon. R: Revertentes. 1kb: Marcador. pNIL160: controle positivo para a reação de PCR.

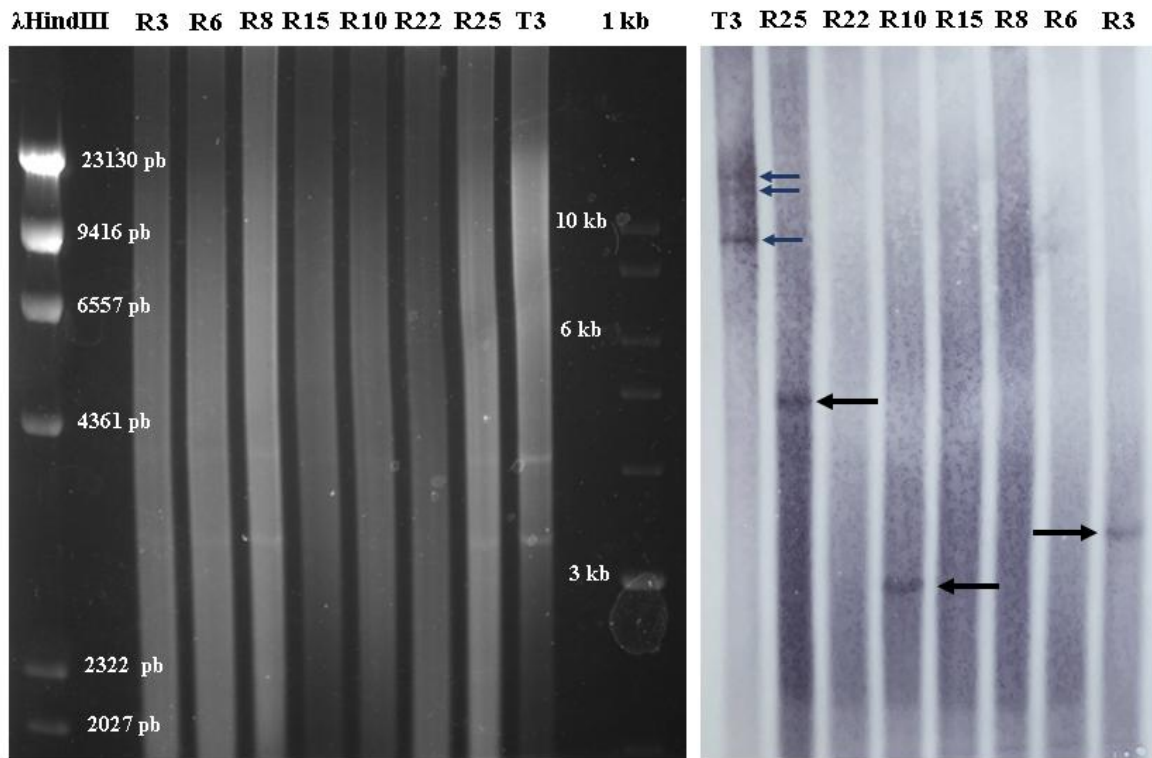


Figura 5. Caracterização molecular dos revertentes *NiaD*⁺ derivados da linhagem T3. O DNA total foi clivado com *ApaI*, os fragmentos foram separados em gel de agarose 0,8%, transferidos para uma membrana de nylon e hibridizados com a sequência de 573 pb do gene que codifica a transposase do *Impala*. As setas azuis indicam as cópias do pNIL160 presentes no transformante T3; as setas pretas indicam o *Impala* inserido em novas posições no genoma de *C. truncatum*.

4. DISCUSSÃO

As abordagens genéticas frequentemente induzem mutações de perda de função em um gene para analisar o fenótipo resultante. Abordagens genéticas modernas utilizam mutagênese sítio-dirigida para perturbar genes específicos, previamente associados ao fenótipo de interesse, limitando-se ao conhecimento já disponível na literatura. Em contrapartida, as abordagens clássicas aplicam a mutagênese aleatória para a obtenção de uma coleção de mutantes, que são rastreados para um fenótipo de interesse (Lyon e Billmyere, 2024). Essa abordagem é especialmente interessante porque permite a descoberta da função de genes ainda não explorados. Mutagênicos químicos e físicos, como metanossulfato de etila (EMS) e radiação ultravioleta (UV), são eficazes na geração de mutantes em fungos (Aljammal et al., 2022; Suryadi et al., 2022). Entretanto, esses agentes mutagênicos podem causar múltiplas mutações

simultaneamente, de forma que um único isolado mutante pode ter várias alterações genéticas. Isso torna a identificação da mutação responsável pelo fenótipo de interesse um processo bem complicado (Lyon e Billmyere, 2024).

A mutagênese insercional supera esse desafio ao interromper genes com um fragmento de DNA exógeno, permitindo que a sequência afetada seja recuperada por abordagens de PCR, seguidas de sequenciamento (Lyon e Billmyere, 2024). A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) já foi utilizada para gerar mutantes insercionais em diversas espécies de *Colletotrichum*, incluindo *C. lagenarium*, *C. higginsianum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. trifolii*, *C. magnum* (Tsuji et al., 2003; Takahara et al., 2004; Talhinhos et al., 2008; Huser et al., 2009; Cai et al., 2013; Guo et al., 2023) e, também, *C. truncatum* (Ayuong et al., 2012). Entretanto o sucesso da ATMT é extremamente dependente de uma alta eficiência de transformação, a qual é influenciada por muitos fatores inerentes da técnica e específicos do organismo de estudo, o que requer otimizações que podem ser onerosas (Nabi et al., 2022; Michielse et al., 2005).

Elementos transponíveis também são amplamente utilizados para gerar mutantes insercionais. Eles são vantajosos quando comparados ao uso da ATMT porque a única etapa de transformação necessária é a aquela usada para construir a linhagem inicial (Chow et al., 2024). Neste trabalho, utilizamos um elemento autônomo da Classe II, membro da superfamília *Tc1/Mariner*, para testar pela primeira vez a transposição heteróloga em *C. truncatum*. Foi demonstrado que *Impala* transpõe eficientemente no genoma dessa espécie. A taxa de excisão observada para o transformante T3 ($74,9/10^6$ esporos) foi maior que a observada em *P. griseoroseum* (Queiroz e Daboussi, 2003) e *A. nidulans* (Li Destri Nicosia et al., 2001) e se aproxima do que foi descrito para *M. grisea*, $71/10^6$ conídios para o transformante Trf-13 e $83/10^6$ conídios para o transformante Trf-08 (Villalba et al., 2000). Em *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis, foi observado até 165 colônias revertentes por 10^3 conídios plaqueados, o que representa uma taxa maior de eventos de excisão (Mighelli et al., 2000). Esses dados indicam que a transposição de *Impala* em *C. truncatum* ocorreu em uma frequência adequada para que o elemento seja usado como ferramenta de mutagênese insercional nessa espécie.

Rao et al. (2018) identificaram 562 elementos transponíveis da Classe I completos e intactos, portanto potencialmente ativos e observaram também explosões recentes de retrotransposons no genoma desse patógeno. Esses dados sugerem que *Impala* encontrou um ambiente propício para a sua transposição, tendo em vista que *C. truncatum* parece suportar elementos potencialmente ativos em seu genoma. Isso justifica o elevado número de eventos de

transposição observados para esta espécie, refletido no número de revertentes obtidos. A presença de outros elementos *Tc1/Mariner* no genoma desse fungo pode influenciar a estabilidade do *Impala*, ao passo que ele pode ser mobilizado por uma transposase de outro elemento. Isso pode ser verificado inserindo uma cópia defeituosa de *Impala* em *C. truncatum*.

Ao transpor, o elemento transponível pode reinserir em um novo local ou pode ser perdido. Deste modo, o uso de um transposon como ferramenta de mutagênese insercional requer uma alta frequência de reinserção. Neste estudo, 3 dos 7 revertentes analisados apresentaram reinserções do *Impala*, indicando uma frequência de reinserção de aproximadamente 43%. Isso representa uma eficiência maior que a de *Impala* para *A. fumigatus* (Firon et al., 2003) e *Geomyces* sp. (Ding et al., 2022). Contudo, a eficiência de reinserção foi menor que a descrita para *F. oxysporum* f. sp. melonis e *M. grisea*, patógenos em que o *Impala* foi utilizado para marcar genes de patogenicidade (Mighelli et al., 2000; Villalba et al., 2001). Entretanto, limitações na técnica utilizada para verificar a reinserção dificultaram uma análise precisa. Portanto, a frequência de reinserção aqui apresentada pode estar subestimada.

O perfil de reinserção observado por Southern Blot neste estudo indica que *Impala* reinseriu em um sítio diferente em cada revertente, o que sugere eventos de transposição independentes e a capacidade de reinserção aleatória. O viés de inserção geralmente representa uma limitação ao uso de transposons para marcação gênica. Para mutagênese insercional é desejável que as inserções do transposon ocorram preferencialmente dentro de regiões codificadoras (Chow et al., 2024). Portanto, o contexto de inserção de *Impala* em *C. truncatum* deve ser verificado com mais precisão usando abordagens baseadas em PCR e sequenciamento.

Os resultados mostrados neste estudo indicam que *Impala* transpõe eficientemente em *C. truncatum*, com uma frequência de reinserção próxima ao que já foi observado em outros fungos, o que evidencia o seu potencial de uso para mutagênese insercional nesta espécie. Além disso, os dados mostrados corroboram com a ideia já proposta anteriormente de que *Impala* transpõe por meio de um mecanismo conservado, que não depende de características específicas do hospedeiro (Plasterk et al., 1999). Contudo, o potencial de *Impala* para marcação de genes envolvidos na patogenicidade de *C. truncatum* ainda precisa ser validado. Para isso, a biblioteca de candidatos a mutantes insercionais obtida neste estudo será triada futuramente visando a identificação de linhagens com alterações na patogenicidade.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho relata pela primeira vez a transposição heteróloga em *C. truncatum*. Foi demonstrado que a transposição eficiente de *Impala* pode ser usada para mutagênese insercional

aleatória, por meio de uma estratégia capaz de gerar um grande número de linhagens com transposição em uma única etapa e que não depende de uma alta eficiência de transformação. Esse conhecimento pode ser útil para alavancar estudos de genômica funcional em *C. truncatum* futuramente.

6. REFERÊNCIAS

- ALJAMMAS, H. A.; YAZJI, S.; AZIZIEH, A. Enhancement of protease production from *Rhizomucor miehei* by mutagenesis with ethyl methanesulfonate, ultraviolet, and microwaves—a preliminary study. **Bioresource Technology Reports**, v. 20, p. 101287, 2022.
- AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 372-382, 2012.
- BAUTISTA, D. E.; CARR, J.F.; MITCHELL, A. M. Suppressor mutants: history and today's applications. **EcoSal Plus**, v. 9, n. 2, p. eESP-0037-2020, 2021.
- BHADARIA, V. et al. Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 2-11, 2013.
- BILLORE, S. D. et al. Soybean Based Intercropping Systems in India—A Review. **Soybean Research**, v. 9, p. 1-30, 2011.
- BOUFLEUR, T. R. et al. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 393-409, 2021.
- BOURQUE, G. et al. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology**, v. 19, p. 1-12, 2018.
- CAI, Z. et al. Identifying pathogenicity genes in the rubber tree anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* through random insertional mutagenesis. **Microbiological Research**, v. 168, n. 6, p. 340-350, 2013.
- CAMPOS, M. D. et al. High throughput sequencing unravels tomato-pathogen interactions towards a sustainable plant breeding. **Horticulture Research**, v. 8, 2021.
- CAMPOS, M. D. et al. Plant-pathogen interaction. **Biology**, v. 10, n. 5, p. 444, 2021.
- CARR, P. D. et al. The transposon *Impala* is activated by low temperatures: use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 438-448, 2010.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 15, p. 225-226, 1939.
- CHOW, E. W. L. et al. Genome-wide profiling of *piggyBac* transposon insertion mutants reveals loss of the F1F0 ATPase complex causes fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Molecular Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 781-797, 2024.
- COVE, D. J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. **Heredity**, v. 36, n. 2, p. 191-203, 1976.

- CUTLER, S. B.; COOLEY, R. N.; CATEN, C. E. Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagonospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. **Current Genetics**, v. 34, p. 128-137, 1998.
- DABOUSSI, M. J.; LANGIN, T. Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genetica**, v. 93, p. 49-59, 1994.
- DAWSON, H. N.; BURLINGAME, R.; CANNONS, A. C. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. **Current Microbiology**, v. 35, p. 356-362, 1997.
- DIAS, M. D. et al. Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 459, 2019.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 18-23, 2016.
- DING, L. et al. Transposon insertion mutation of Antarctic psychrotrophic fungus for red pigment production adaptive to normal temperature. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. kuab073, 2022.
- FAO. *FAOSTAT: Food and Agriculture Data*. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 20 mar. 2025.
- FIRON, A. et al. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 247-255, 2003.
- GAFFIELD, K. N. et al. A review of soybean processing byproducts and their use in swine and poultry diets. **Translational Animal Science**, v. 8, p. txae063, 2024.
- GAO, Q. et al. Transposon mutagenesis identifies the sspA-sspB operon as essential for serum resistance and virulence in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 301, p. 110345, 2025.
- GARDE, J.; KINGHORN, J. R.; TOMSETT, A. B. Site-directed Mutagenesis of Nitrate Reductase from *Aspergillus nidulans*: Identification of Some Essential and Some Nonessential Amino Acids Among Conserved Residues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 12, p. 6644-6650, 1995.
- GUO, Z. et al. Identifying pathogenicity-related genes in the pathogen *Colletotrichum magnum* causing watermelon anthracnose disease via T-DNA insertion mutagenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1220116, 2023.
- HASSAN, A. H.; MOKHTAR, M. M.; EL ALLALI, A. Transposable elements: multifunctional players in the plant genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1330127, 2024.
- HUA-VAN, A. et al. Three highly divergent subfamilies of the *Impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular and General Genetics**, v. 259, p. 354-362, 1998.
- HUSER, A. et al. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 2, p. 143-156, 2009.

- IDNURM, A. et al. A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of *Agrobacterium*-mediated transformation of fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, p. 1-28, 2017.
- JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014.
- KAWAMURA, M. et al. Novel polymeric supports for lipase immobilization and their application in the transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Fuel**, v. 388, p. 134547, 2025.
- KINDLE, K. L. et al. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 6, p. 2589-2601, 1989.
- LANGRIDGE, G. C. et al. Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2308-2316, 2009.
- LI DESTRI NICOSIA, Maria. G. et al. Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1330-1344, 2001.
- LIU, F.; CHEEWANGKOON, R.; ZHAO, R-L. Discovery of a New Starship Transposon Driving the Horizontal Transfer of the *ToxA* Virulence Gene in *Alternaria ventricosa*. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 376, 2025.
- LOPES, F. R. et al. Transcriptional activity, chromosomal distribution and expression effects of transposable elements in Coffea genomes. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78931, 2013.
- LU, X. et al. Proteinaceous effector discovery and characterization in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 914035, 2022.
- LYON, J. W.; BILLMYRE, R. B. Recent Advances in High-Throughput Genetics in Fungi. **Fungal Genomics**, p. 51-65, 2024.
- MAUL, J. E. et al. Genomic and mutational analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* EB037 pathogenicity on sunflower. **BMC Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 43, 2025.
- MELLO, F. E. et al. Sensitivity of *Colletotrichum plurivorum* and *C. truncatum* isolated from soybean in Brazil to SDHIs and DMIs fungicides. **Tropical Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 83-92, 2024.
- MICHIELSE, C. B. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, p. 1-17, 2005.
- MIGHELI, Q. et al. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1279-1284, 2000.
- MÖLLER, M.; STUKENBROCK, Eva H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 756-771, 2017.
- NABI, A. et al. Optimizing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation conditions in *Colletotrichum lindemuthianum*: a step forward to unravel the functions of pathogenicity arsenals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 293-307, 2022.

- NELSON, R. T.; PRYOR, B. A.; LODGE, J. K. Sequence length required for homologous recombination in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2003.
- NIU, K-M. et al. Functional analysis of quorum sensing-mediated pathogenicity in *Burkholderia contaminans* SK875 using transposon mutagenesis. **Microbial Pathogenesis**, p. 107332, 2025.
- PEREIRA, J. F. et al. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 891-900, 2004.
- PEREIRA, J. F. et al. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 74-85, 2003.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- PUNT, P. J. et al. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene**, v. 56, n. 1, p. 117-124, 1987.
- QIN, P.; WANG, T.; LUO, Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, p. 100265, 2022.
- QUEIROZ, M. V.; DABOUSSI, M-J. *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n. 2, p. 317-321, 2003.
- RAO, S. et al. The landscape of repetitive elements in the refined genome of chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2367, 2018.
- RAO, S.; NANDINENI, M. R. Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0183567, 2017.
- ROGÉRIO, F. et al. Genome sequence resources of *Colletotrichum truncatum*, *C. plurivorum*, *C. musicola*, and *C. sojae*: four species pathogenic to soybean (*Glycine max*). **Phytopathology**, v. 110, n. 9, p. 1497-1499, 2020.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning-Sambrook & Russel-Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harbor Lab Press: Long Island, NY, USA**, 2001.
- SHI, N. et al. Resistance Risk and Novel Resistance-Related Point Mutations in Target Protein Cyt b of Florylpicoxamid in *Colletotrichum truncatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2025.
- SOARES, M. A. et al. *PacCl*, a pH-responsive transcriptional regulator, is essential in the pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum*, a causal agent of anthracnose in bean plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, p. 769-785, 2014.
- SPECHT, C. A. et al. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158-163, 1982.

- STEIN, H. H. et al. Nutritional properties and feeding values of soybeans and their coproducts. In: **Soybeans**. AOCS Press, 2008. p. 613-660.
- SURYADI, H.; IRIANTI, M. I.; SEPTIARINI, T. H. Methods of random mutagenesis of *Aspergillus* strain for increasing kojic acid production. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 486-494, 2022.
- SWEIGARD, J. A.; EBBOLE, D. J. Functional analysis of pathogenicity genes in a genomics world. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 387-392, 2001.
- TALHINHAS, P. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. **Molecular Biotechnology**, v. 39, p. 57-67, 2008.
- TAKAHARA, H. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, p. 93-96, 2004.
- TORRES, D. E.; THOMMA, B. P. H. J.; SEIDL, M. F. Transposable elements contribute to genome dynamics and gene expression variation in the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 7, p. evab135, 2021.
- TSUJI, G. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p. 230-239, 2003.
- VAN OPIJNEN, T.; LEVIN, H. L. Transposon insertion sequencing, a global measure of gene function. **Annual Review of Genetics**, v. 54, n. 1, p. 337-365, 2020.
- VILLALBA, F. et al. *Transposon Impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 308-315, 2001.
- WANG, K. et al. Nutritional values of soybean meal from different sources in multiparous sows. **Animal Nutrition**, v. 20, p. 80-87, 2025.
- WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.
- YAMADA, M. et al. Preparation of bioplastic using soy protein. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 1077-1083, 2020.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho relata pela primeira vez a transposição heteróloga em *Colletotrichum lindemuthianum* e *C. truncatum*. Foi mostrado que *Impala* é ativo nos genomas de ambos os fitopatógenos, embora apresente frequências de transposição distintas entre eles. *C. lindemuthianum* apresentou uma taxa de transposição bem menor em comparação a *C. truncatum*, o que pode estar associado ao contexto genômico intrínseco dessas espécies.

Os resultados indicam que a eficiência de transposição e perfil de reinserção de *Impala* nos fungos estudados se assemelham ao observado para esse elemento em outros gêneros, corroborando à ideia de que *Impala* transpõe por meio de um mecanismo conservado, independente das características do hospedeiro. Essa característica reforça o potencial de *Impala* para ser usado como ferramenta de mutagênese insercional aleatória em *Colletotrichum* spp.

Para explorar melhor essa possibilidade, estudos adicionais, baseados em PCR e sequenciamento, são necessários para verificar com maior precisão o contexto de reinserção de *Impala* e as pegadas deixadas pelo elemento durante da transposição. Além disso, otimizações na transposição de *Impala* em *C. lindemuthianum* poderão aumentar o número de candidatos a mutantes insercionais. Isso pode ser alcançado usando linhagens defectivas para o sistema de RNA de interferência (RNAi). Para confirmar de fato o potencial de *Impala* na marcação de genes envolvidos na patogênese, é fundamental realizar a triagem das bibliotecas de candidatos a mutantes geradas, visando alterações na patogenicidade.

Este estudo amplia o conhecimento sobre a atividade de elementos transponíveis no gênero *Colletotrichum* ao mesmo tempo em que abre novas perspectivas para aplicação dos transposons como ferramenta molecular no gênero. Assim, este trabalho contribui para o avanço dos estudos sobre a biologia molecular desses fitopatógenos, oferecendo informações para o desenvolvimento de estratégias que minimizem impactos negativos gerados por esses fungos na agricultura.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Efeito de diferentes condições de estresse sobre a transposição de *Impala*.

Conídios do transformante T26 foram incubados em tampão de fosfato de sódio monobásico 0,4M (pH 9), em NaCl 1M, H₂O₂ 10mM e CuSO₄ 100 mM, a 22°C, por 3 horas. Para o tratamento de choque térmico, conídios do transformante T26 foram incubados a 42°C por 3 horas. Em seguida, suspensões de 1x10⁶conídios/mL foram inoculadas em placas de Petri contendo meio CZAPECK-DOX, com nitrato como única fonte de nitrogênio. Todas as placas foram incubadas a 22°C, por 30 dias. Como controle, uma suspensão de conídios (1x10⁶ conídios/mL) foi inoculada em placas contendo meio CZAPECK-DOX, e incubadas a 22°C, por 30 dias. Para cada tratamento foram feitas 10 repetições independentes. Cada colônia revertente observada foi considerada como um evento de transposição independente.

Tabela A.1 – Contagem de colônias revertentes (NiaD⁺) obtidas por placa de Petri em cada tratamento de estresse aplicado ao transformante T26.

Placa	Controle	Choque térmico	pH 9	NaCl 1M	H ₂ O ₂ 10 mM	CuSO ₄ 100 mM
1	0	2	2	1	0	1
2	0	0	1	1	0	0
3	1	2	0	1	2	1
4	1	0	2	5	0	1
5	1	0	0	1	2	1
6	1	1	5	0	0	3
7	1	2	2	0	0	0
8	0	1	0	0	0	0
9	2	2	0	0	2	3
10	2	2	2	2	2	3

NOTA: Cada valor representa o número de colônias NiaD⁺ obtidas por placa de Petri (n = 10 por tratamento).

Tabela A.2 - Média e Variância da contagem de colônias revertentes (NiaD⁺) por tratamento.

Tratamento	Média	Variância
Controle	0,9	0,544
Choque térmico	1,2	0,844
pH 9	1,4	2,490
NaCl 1M	1,1	2,320
H ₂ O ₂ 10 mM	0,8	1,070
CuSO ₄ 100 mM	1,3	1,570

Nota: Médias e variâncias calculadas com base em 10 repetições independentes por tratamento.

Tabela A.3 – Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão binomial negativa ajustado para a contagem de colônias revertentes.

Tratamento	Estimativa (log)	Erro padrão	z valor	p-valor
Controle	-0,1054	0,3575	-0,295	0,768
Choque térmico	0,2877	0,4774	0,603	0,547
pH 9	0,4418	0,4647	0,951	0,342
NaCl 1M	0,2007	0,4852	0,414	0,679
H ₂ O ₂ 10 mM	-0,1178	0,5192	-0,227	0,821
CuSO ₄ 100 mM	0,3677	0,4706	0,781	0,435

Nota: Modelo de regressão binomial negativa ajustado com função de ligação log, considerando o tratamento como variável explicativa (fator). Os coeficientes foram estimados em relação ao controle. Nenhuma das estimativas apresentou significância estatística ($p > 0,05$).

Tabela A.4 – Comparações múltiplas entre tratamentos com base no teste de Tukey, aplicadas ao modelo de regressão binomial negativa.

Comparação	Diferença estimada	Erro padrão	z valor	p-valor
Controle – Choque térmico	-0,2877	0,477	-0,603	0,991
Controle – pH 9	-0,4418	0,465	-0,951	0,933
Controle – NaCl 1M	-0,2007	0,485	-0,414	0,998
Controle – H ₂ O ₂ 10 mM	0,1178	0,519	0,227	0,999
Controle – CuSO ₄ 100 mM	-0,3677	0,471	-0,781	0,971
Choque térmico – pH 9	-0,1542	0,434	-0,355	0,999
Choque térmico – NaCl 1M	0,087	0,456	0,191	1
Choque térmico – H ₂ O ₂ 10 mM	0,4055	0,492	0,825	0,963
Choque térmico – CuSO ₄ 100 mM	-0,08	0,44	-0,182	1
pH 9 – NaCl 1M	0,2412	0,442	0,545	0,994
pH 9 – H ₂ O ₂ 10 mM	0,5596	0,479	1,167	0,853
pH 9 – CuSO ₄ 100 mM	0,0741	0,426	0,174	1
NaCl 1M – H ₂ O ₂ 10 mM	0,3185	0,499	0,638	0,988
NaCl 1M – CuSO ₄ 100 mM	-0,1671	0,449	-0,372	0,999

H₂O₂ 10 mM – CuSO₄ 100 mM	-0,4855	0,485	-1,001	0,918
---	---------	-------	--------	-------

Nota: Diferenças estimadas entre pares de tratamentos apresentadas na escala logarítmica da resposta. Nenhuma comparação apresentou significância estatística ($p > 0,05$).

APÊNDICE B – Classificação fenotípica dos mutantes resistentes ao clorato.

A Tabela B.1 apresenta a caracterização fenotípica de 85 mutantes resistentes ao clorato, obtidos neste estudo, com base em testes de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. O crescimento foi avaliado nas seguintes fontes: amônio, hipoxantina, nitrito e nitrato. A presença (+) ou ausência (-) de crescimento foi registrada. As mutações foram inferidas com base no perfil fenotípico de crescimento e na classificação proposta por Cove (1976). Os mutantes com mutações no gene da redutase do nitrato (*nitI*) estão destacados em amarelo.

Tabela B.1 – Caracterização fenotípica de 85 mutantes resistentes ao clorato obtidos neste estudo, com base em testes de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio.

Mutante	Amônio	Hipoxantina	Nitrito	Nitrato	Mutação inferida
1	+	+	+	-	<i>nitI</i>
2	+	+	+	+	<i>crnA</i>
3	+	+	+	-	<i>nitI</i>
4	+	+	+	-	<i>nitI</i>
5	+	+	+	+	<i>crnA</i>
6	+	+	+	-	<i>nitI</i>
7	+	+	-	-	<i>nirA</i>
8	+	+	+	-	<i>nitI</i>
9	+	+	+	-	<i>nitI</i>
10	+	+	+	-	<i>nitI</i>
11	+	-	-	-	<i>areA</i>
12	+	-	+	-	<i>cnxA-J</i>
13	+	+	+	-	<i>nitI</i>
14	+	+	+	+	<i>crnA</i>
15	+	+	+	+	<i>crnA</i>
16	+	+	+	+	<i>crnA</i>
17	+	+	+	-	<i>nitI</i>
18	+	+	+	-	<i>nitI</i>
19	+	+	+	+	<i>crnA</i>
20	+	+	+	-	<i>nitI</i>
21	+	+	+	-	<i>nitI</i>
22	+	+	+	-	<i>nitI</i>
23	+	+	+	+	<i>crnA</i>
24	+	+	+	-	<i>nitI</i>
25	+	+	+	+	<i>crnA</i>
26	+	+	+	-	<i>nitI</i>
27	+	+	+	+	<i>crnA</i>

28	+	+	+	-	<i>nitI</i>
29	+	+	+	+	<i>crnA</i>
30	+	+	+	-	<i>nitI</i>
31	+	+	+	-	<i>nitI</i>
32	+	+	+	-	<i>nitI</i>
33	+	+	+	+	<i>crnA</i>
34	+	+	+	-	<i>nitI</i>
35	+	+	+	-	<i>nitI</i>
36	+	+	+	-	<i>nitI</i>
37	+	+	+	-	<i>nitI</i>
38	+	+	+	+	<i>crnA</i>
39	+	+	+	+	<i>crnA</i>
40	+	+	-	-	<i>nirA</i>
41	+	+	+	-	<i>nitI</i>
42	+	+	+	+	<i>crnA</i>
43	+	+	+	-	<i>nitI</i>
44	+	+	+	-	<i>nitI</i>
45	+	+	-	-	<i>nirA</i>
46	+	+	+	-	<i>nitI</i>
47	+	+	+	-	<i>nitI</i>
48	+	+	+	-	<i>nitI</i>
49	+	+	+	-	<i>nitI</i>
50	+	+	+	-	<i>nitI</i>
51	+	+	+	-	<i>nitI</i>
52	+	+	+	+	<i>crnA</i>
53	+	+	+	-	<i>nitI</i>
54	+	+	+	-	<i>nitI</i>
55	+	+	+	+	<i>crnA</i>
56	+	+	+	-	<i>nitI</i>
57	+	+	+	+	<i>crnA</i>
58	+	+	+	+	<i>crnA</i>
59	+	+	+	-	<i>nitI</i>
60	+	+	+	+	<i>crnA</i>
61	+	+	+	-	<i>nitI</i>
62	+	+	+	-	<i>nitI</i>
63	+	+	+	+	<i>crnA</i>
64	+	+	+	-	<i>nitI</i>
65	+	+	+	+	<i>crnA</i>
66	+	+	+	-	<i>nitI</i>
67	+	+	+	-	<i>nitI</i>
68	+	+	+	+	<i>crnA</i>
69	+	+	+	+	<i>crnA</i>
70	+	+	+	+	<i>crnA</i>
71	+	+	+	-	<i>nitI</i>
72	+	+	+	-	<i>nitI</i>
73	+	+	+	-	<i>nitI</i>
74	+	-	+	-	<i>cnxA-J</i>
75	+	+	+	+	<i>crnA</i>

76	+	+	+	+	<i>crnA</i>
77	+	+	+	+	<i>crnA</i>
78	+	+	+	+	<i>crnA</i>
79	+	+	+	-	<i>nitl</i>
80	+	+	+	-	<i>nitl</i>
81	+	+	+	+	<i>crnA</i>
82	+	+	+	-	<i>nitl</i>
83	+	+	+	+	<i>crnA</i>
84	+	+	+	+	<i>crnA</i>
85	+	+	+	-	<i>nitl</i>

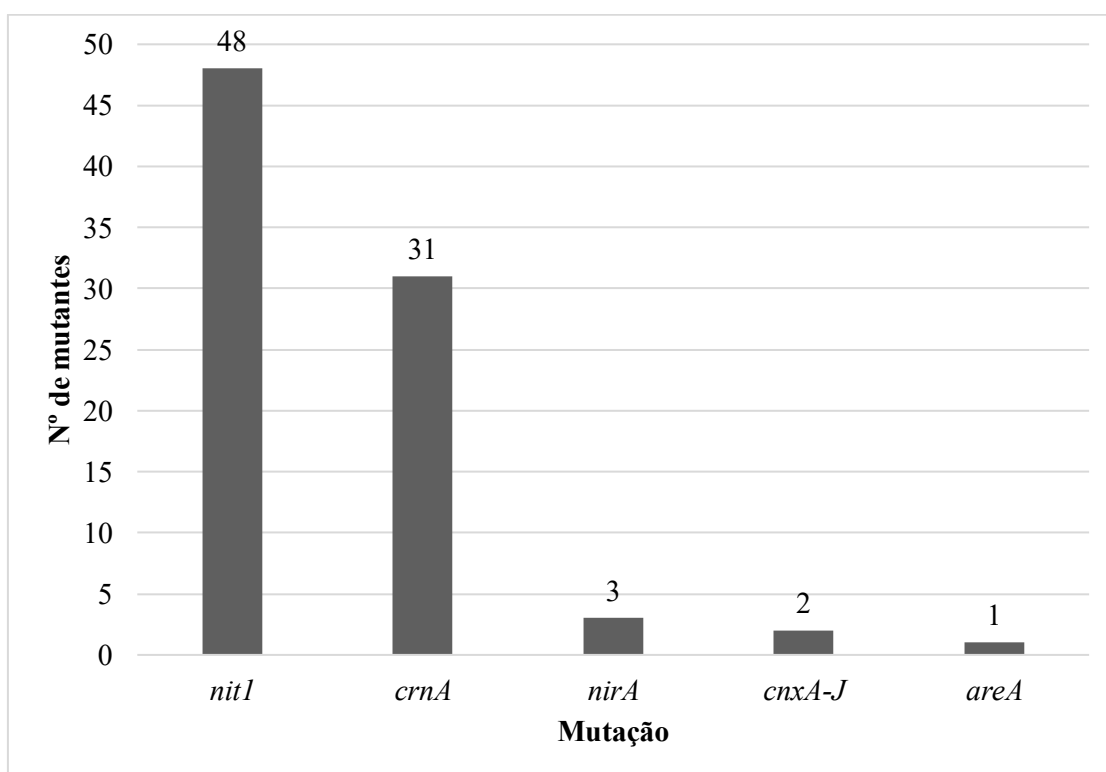


Figura B.1. Resumo gráfico do número de mutantes por tipo de muta o na via de assimila o do nitrato, com base nos dados apresentados na Tabela B.1.