

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Pesquisa de Elementos Transponíveis no fungo
fitopatógeno Colletotrichum sublineolum***

ORIENTADO: **Marco Aurélio Soares**

ORIENTADORA: **Profa. Dra. Adlane Vilas-Boas Ferreira**

BELO HORIZONTE

Dezembro – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marco Aurélio Soares

***Pesquisa de Elementos Transponíveis no fungo
fitopatígeno Colletotrichum sublineolum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientadora: Profa. Dra. Adlane Vilas-Boas Ferreira

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

2007

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita."

Mahatma ghandi

**A Deus, criador da vida, por me guiar e possibilitar mais uma conquista,
dedico.**

Aos meus pais José Eustáquio Soares e Maria de Fátima Soares

aos meus irmãos Paulo Henrique e Shirley

à minha noiva Suede,

ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida;

Aos meus pais, José Eustáquio Soares e Maria de Fátima Soares, pelo esforço e orações;

Aos meus irmãos, Shirley e Paulo Henrique, pela ajuda e incentivo;

À minha noiva Suede, pelo amor e carinho;

À minha tia Cida, tio Jorge e primos Júnior, Samir e Sued pela acolhida e carinho;

A todos os meus familiares que de uma forma ou outra me incentivaram e ajudaram;

À minha orientadora Dra. Adlane pela paciência, carinho e ensinamentos.

A todos os professores pela amizade e ensinamentos;

Aos meus colegas de Laboratório, pela amizade e dedicação nas horas difíceis;

Aos estagiários Bianca, Juan e Ana pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Muito Obrigado

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O sorgo.....	12
1.2 O fungo Colletotrichum sublineolum	12
1.3 A Antracnose	13
1.4 Mecanismos de Variabilidade	15
1.5 Elementos transponíveis (TEs).....	16
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Isolados de C. sublineolum e condições de cultivo.....	26
3.2 Extração do DNA	27
3.3 Meios de Cultura.....	29
3.3.1 Meio de farinha de aveia e agar - FAA.....	29
3.3.2 Meio Sabouraud (líquido) (Pelczar, 1916).....	29
3.4 <i>Primers</i> e PCR	30
3.5 Clonagem e sequenciamento	34
3.6 Análise de sequências de DNA	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÃO.....	51
6 PERSPECTIVAS	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos macromorfológicos de Isolados de <i>Colletotrichum sublineolum</i> .	14
Figura 2 - Estruturas Gerais dos elementos transponíveis em eucariotos	16
Figura 3 - Representação estrutural dos elementos classe I em eucariotos	17
Figura 4 – Esquema geral dos transposons <i>Fot 1</i> e <i>Impala</i>	22
Figura 5 – PCR com <i>primers</i> para amplificação do gene β -tubulina	37
Figura 6 – PCR com <i>primers</i> para amplificação do elemento <i>Ccret 2</i>	38
Figura 7 – PCR com primers para amplificação do gene da integrase de <i>E.coli</i>	41
Figura 8 - PCR com <i>primers</i> para amplificação do gene da integrase de <i>E.coli</i> – Controle com <i>primers</i> isolados	43
Figura 9 - PCR com primers para amplificação das LTRs em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	45
Figura 10 - PCR gradiente com <i>primers</i> para amplificação das LTRs em <i>P. brasiliensis</i>	46
Figura 11 - PCR gradiente com primers para amplificação da ORF da integrase de <i>P. brasiliensis</i> em <i>Colletotrichum sublineolum</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação geral dos elementos transponíveis classe I em fungos	19
Tabela 2 - Classificação geral dos elementos transponíveis classe II em fungos	20
Tabela 3 – Identificação e procedência dos isolados de <i>Colletotrichum sublineolum</i>	26
Tabela 4 – DNAs usados como controles nas reações de PCR	27
Tabela 5 – Elementos transponíveis pesquisados em <i>C.sublineolum</i>	31
Tabela 6 – BlastN das seqüências dos clones de uma possível integrase	42
Tabela 7 - BlastX das seqüências dos clones de uma possível integrase	43

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Cgret</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> retrotransposon
CN	Controle negativo
<i>Cosret</i>	<i>Colletotrichum sublineolum</i> retrotransposon
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAA	Farinha de aveia e ágar
FAO	Food and Agriculture Organization
HCL	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITR	Repetições terminais invertidas
ITS	Sequência inter-gênicas
KB	Kilo base
LTR	Longas repetições terminais
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
ORF	Sequência aberta de leitura
PbRtp	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> retrotransposon
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial Hidrogeniônico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RIP	Mutação induzida por repetição
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TE	Elementos transponíveis

RESUMO

O sorgo é um dos cereais mais cultivados no mundo, e só no Brasil a produção ultrapassa a casa do milhão de toneladas. Dentre os patógenos do sorgo encontra-se o fungo *Colletotrichum sublineolum* causador da antracnose, doença mais importante para a cultura do sorgo. Este fungo apresenta alta variabilidade genética o que dificulta o seu controle. Nós propusemos a pesquisar a presença de elementos transponíveis no genoma de 24 isolados brasileiros de *C.sublineolum* considerando a presença desses elementos dentre as causas da sua variabilidade genética. A pesquisa foi feita utilizando-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com *primers* específicos para amplificação de transposons e retrotransposons baseados em seqüências dos elementos *Fot 1* e *Impala* (do gênero *Fusarium*), e LTRs de *Cgret* e *Ccret* (do gênero *Colletotrichum*). Amplificações com estes pares de *primers* não foram observadas nos nossos isolados. *Primers* descritos para amplificação de elementos transponíveis no fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e na bactéria *Escherichia coli* também foram utilizados. Nos isolados de *C. sublineolum* obteve-se um fragmento de 400pb que apresentou pequena similaridade com integrons Classe I de bactérias e com proteínas desconhecidas de fungos. Obtiveram-se também dois fragmentos de 500 e 1000pb utilizando-se os *primers* para amplificação da integrase de *P. brasiliensis*. Nos isolados de *P. brasiliensis* um fragmento de 850pb foi observado na amplificação com *primers* descritos para LTRs de *C. gloeosporioides*. Os resultados não permitiram afirmar de maneira conclusiva que os fragmentos encontrados são correspondentes a elementos transponíveis. No entanto, podemos concluir que a metodologia utilizada neste trabalho é válida para uma triagem inicial de elementos transponíveis, já que em casos onde ocorre amplificação é possível se aprofundar na caracterização do elemento em questão.

ABSTRACT

Sorghum is one of the most cultivated cereal in the world, and in Brazil only more than one ton is produced per year. *Colletotrichum sublineolum* is the causative agent of anthracnose, the most important disease of sorghum. This fungus exhibits a high genetic variability, what makes control of the disease more difficult. We decided to study the presence of transposable elements in the genome of 24 Brazilian isolates of *C.sublineolum* considering their presence among the causes of the genetic variability. The research was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) with primers specific for amplication of transposons and retrotransposons, based on sequences of the elements *Fot 1* and *Impala* (from the genus *Fusarium*), and *Cgret* and *Ccret* LTRs (from the genus *Colletotrichum*). Amplifications with these primer pairs were not observed in our isolates. Primers described for amplication of transposable elements in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and the bacterium *Escherichia coli* were also utilized. In the *C. sublineolum* isolates a fragment of 400 bp was observed that exhibited a low similarity with bacterial Class I integrons and unknown proteins from fungi. Two other fragments, 500 and 1000 bp, with the primers for *P. brasiliensis* integrase were detected. Using the same methodology with *P. brasiliensis*, a 850 bp fragment was observed with *C. gloeosporioides* LTR primers. The results did not allow to conclusively affirm that the fragments found correspond to transposable elements. However, we can conclude that the methodology utilized in this work is valid for an initial screening of transposable elements, since in cases where amplication occurs a more detailed study can be initiated.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sorgo

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é originário da África do sul e se disseminou pelos continentes Africano, Asiático, Americano e Austrália (Frederiksen, 2000, citado em Costa et al., 2003). Este cereal é considerado um dos mais cultivados no mundo e sua produção mundial atingiu, em 2004, 60 milhões de toneladas (FAO, 2006). No Brasil, o sorgo é cultivado nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul e apresentou safra superior a 1,4 milhões de toneladas em abril de 2006 (IBGE, 2006). Devido à sua grande amplitude de condições de cultivo, o sorgo está sujeito ao ataque de uma variedade de patógenos que podem limitar a quantidade e qualidade de produção (Casela et al., 1997, citado em Costa et al., 2003) e levar ao aparecimento de várias doenças.

1.2 O fungo *Colletotrichum sublineolum*

Dentre os patógenos de sorgo encontra-se *Colletotrichum sublineolum* Henn, um fungo pertencente ao filo Ascomycota, à classe Sordariomycetes e à ordem Phyllachorales. Esse grupo inclui fungos que produzem esporos (conídios) em estruturas reprodutivas denominadas acérvulo (Hawskworth et al., 1983, citado em Leslie, 2002). Até recentemente havia dúvidas se as espécies de *Colletotrichum* que afetam o milho e o sorgo eram diferentes ou não. Diversos trabalhos têm sido feitos com objetivo de estabelecer a relação entre estas espécies. Sutton (1968), citado em Costa et al., (2003), realizou estudos com isolados monoconidiais dos fungos *C. falcatum* e *C. graminicola*, agentes causais da podridão vermelha da cana-de-açúcar e antracnose de milho e sorgo, respectivamente, e concluiu, baseado nas diferenças estruturais de apressórios, que eram espécies distintas. Além disso, o autor

considerou os isolados do milho como pertencentes à espécie *C. graminicola* e propôs a denominação *C. sublineolum* para os isolados oriundos de sorgo. Porém, esta denominação não era muito aceita até que estudos moleculares comparando seqüências de nucleotídeos da região ITS-2 de rDNA de *C. graminicola* oriundos de milho e sorgo indicaram que os isolados representam espécies distintas, confirmando estudos morfológicos anteriores (Sherrif et al., 1995).

1.3 A Antracnose

C. sublineolum causa a antracnose que é considerada a doença mais importante para a cultura do sorgo e está presente em todas as áreas produtoras (Casela et al., 2001). Perdas superiores a 50% da produção já foram relatadas devido à ocorrência de epidemias severas, sob condições úmidas associadas a temperaturas elevadas (Casela et al., 1997, citado em Costa et al., 2003). Como alternativa para evitar estas perdas tem-se a obtenção de cultivares resistente e o controle do fungo. Isto, porém, é dificultado pela alta variabilidade genética, apresentada pelo patógeno com relação à virulência (Costa et al., 2003). Considerando ainda esta variabilidade, trabalhos feitos com isolados de *Colletotrichum graminicola* relataram esta variabilidade. Rosewich et al. (1998) mostraram, através de análise de RFLP, alto grau de variação em nível de DNA. Valério et al., (2005) relataram polimorfismo também em isolados de *C. graminicola* fazendo agrupamento de acordo com suas regiões geográficas. Nos isolados brasileiros usados para este estudo foi observada variabilidade morfológica (Figura 1) e este fato, além dos apresentados em outros trabalhos, motivou a realização deste estudo.

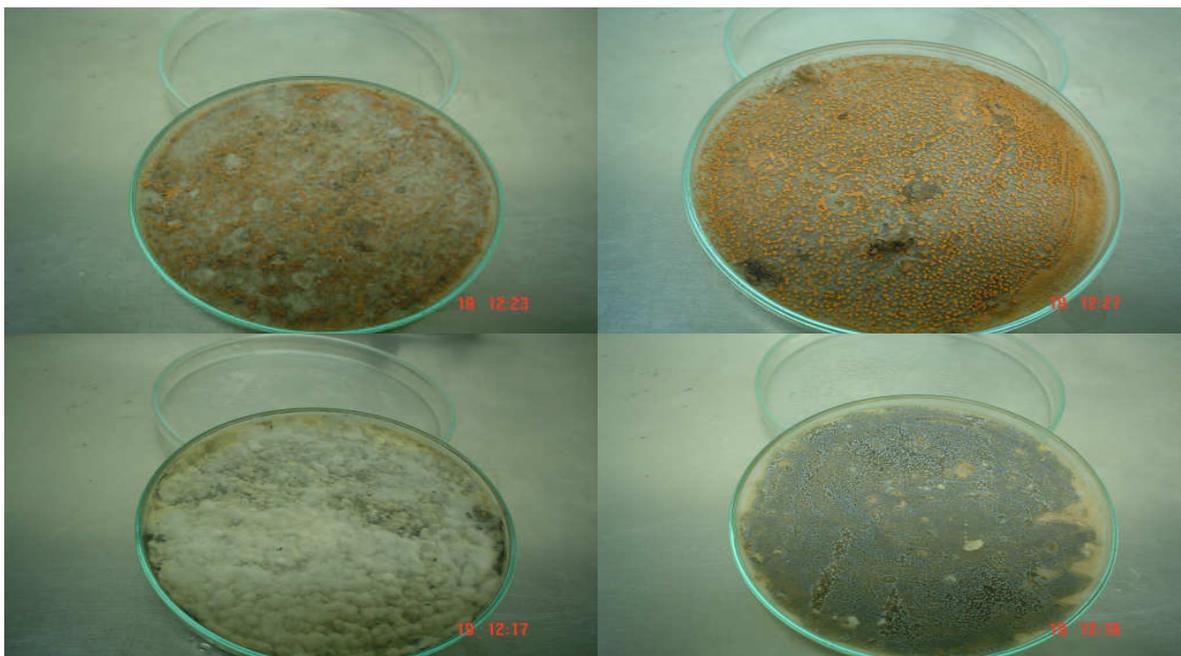


Figura 1- Aspectos macromorfológicos de Isolados de *Colletotrichum sublineolum*.

1.4 Mecanismos de Variabilidade

Dentre os mecanismos que geram a variabilidade genética podem estar as recombinações sexual e assexual e mutação. Entretanto, no caso de *C. sublineolum* a variabilidade por recombinação sexual é discutível, pois o estado teleomórfico (sexual) deste fungo não foi encontrado na natureza, tendo sido obtido raramente somente em condições de laboratório (Vaillancourt et al., 1992). A variabilidade por processos assexuados é possível em *C. sublineolum* através de mecanismos tais como heterocariose, ciclo parassexual, e herança citoplasmática (Moore-Landecker, 1996).

A variabilidade pode também ser devida à presença de elementos transponíveis (TEs) no genoma do fungo (Daboussi, 1997). As mudanças genéticas causadas por esses elementos estão associadas à transposição e recombinação. Estes mecanismos conferem alta taxa de variação genética, o que é um fator importante para populações naturais em períodos de adaptação a mudanças, especialmente aquelas que não apresentam estágio sexual na natureza (Daboussi e Capy, 2003), como é o caso de *C. sublineolum*.

1.5 Elementos transponíveis (TEs)

Os TEs são encontrados em espécies dos três domínios de vida: Bactéria, Archea e Eucarya (Daboussi e Capy, 2003) e são definidos como seqüência de DNA capazes de se mover de um lugar para outro no genoma do hospedeiro. A classificação desses elementos é feita de acordo com o seu modo de transposição e sua organização estrutural sendo, portanto, divididos em duas principais classes (Figura 2): elementos da classe I, que se transpõem por um mecanismo que inclui uma molécula de RNA intermediária, utilizando a enzima transcriptase reversa, e os elementos da classe II, que se transpõem diretamente via DNA (Finnegan, 1989).

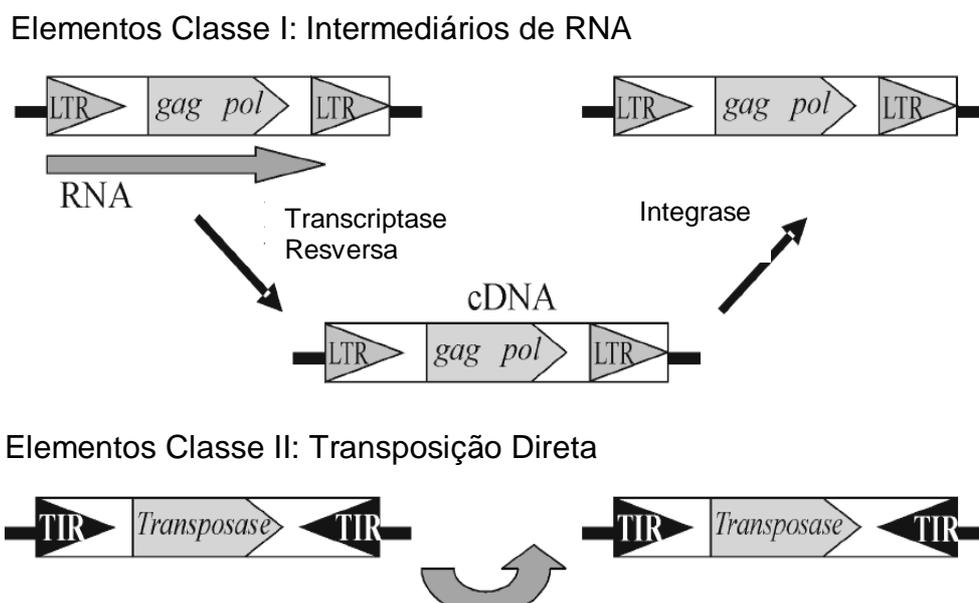


Figura 2 – Estruturas gerais dos elementos transponíveis em eucariotos (Fávaro et al., 2005).

Sejam eles de classe I ou II, os TEs possuem elevado potencial para causar mudanças nos genomas de seus hospedeiros. Suas transposições para dentro ou perto dos genes contribuem para a inativação parcial ou total de genes (Daboussi e Capy, 2003). Um grande número desses elementos foi caracterizado e identificado em fungos, nos últimos anos. As Tabelas 1 e 2 listam diversos TEs descritos e as espécies de fungos onde foram encontradas (Fávaro et al., 2005). Dentre os elementos de Classe I observa-se que a grande parte dos elementos caracterizados pertence ao grupo dos retrotransposons com LTR. Estes elementos se caracterizam por possuírem longas repetições terminais (LTR) e codificarem *gag* (proteínas da cápsula viral) e *pol* (transcriptase reversa, RNase H, integrase e protease). O grupo dos retrotransposons com LTR se subdivide em duas subfamílias (*Metaviridae* e *Pseudoviridae*) que se diferem em relação à ordem de seus genes *pol* (Figura 3)

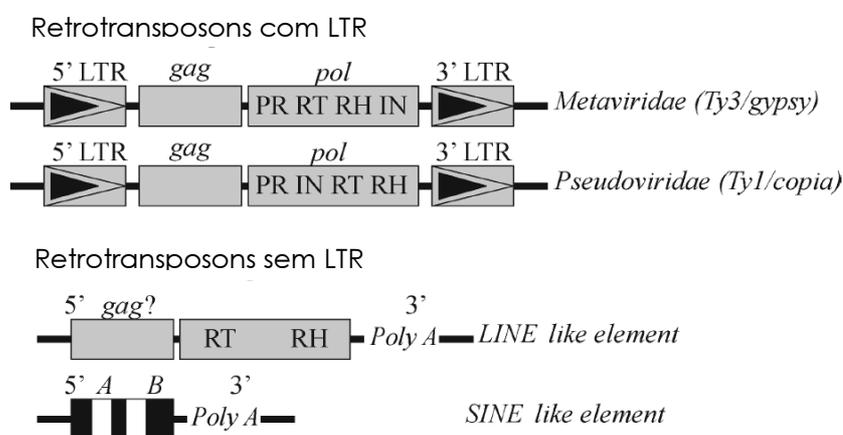


Figura 3 – Representação Estrutural dos elementos classe I em eucariotos (Fávaro et al., 2005).

Os outros elementos conhecidos como retrotransposons sem LTR foram pouco descritos em fungos (Tabela 1). Estes elementos geralmente possuem uma cauda poli-A, não possuem LTRs e são conhecidos como *LINE* (Long Interspersed

Elements) e *SINE* (Short Interspersed Elements). Os elementos *LINE* são caracterizados por carregarem genes *gag* e *pol*. Já os elementos *SINE* são caracterizados por não possuírem estrutura especial, nem os genes *gag* e *pol* e serem derivados de transcritos da RNA polimerase III conforme Figura 3 (Kempken e Kuch, 1998).

Os elementos transponíveis pertencentes à classe II são conhecidos como transposons. Eles são caracterizados por possuírem pequenas repetições terminais (Figura 2) e por causarem duplicação de bases no sítio alvo e conseqüente integração no genoma hospedeiro. Estes elementos são classificados em quatro diferentes superfamílias: *Tc1/Mariner*, *hAT*, *Mutator* and *Mites* (Daboussi e Capy, 2003). A superfamília *Tc1/Mariner* é a mais abundante e seus elementos mais estudados são *Fot1* e *Impala* encontrados em *Fusarium oxysporum* (Kempken e Kuck, 1998). A superfamília *hAT* é caracterizada por possuir similaridade com o elemento *AC* descrito em milho por Bárbara McClintock e é bem representada em fungos basidiomicetos e ascomicetos (Tabela 2). Os elementos da superfamília *Mutator* tinham sido descritos somente em plantas e apenas em 2003 foi descrito pela primeira vez em fungos (Revisado em Fávoro et al., 2005). Já os elementos da superfamília *MITE* (miniatura de elementos transponíveis) descritos em *F. oxysporum* e *Neurospora crassa* são remanescentes de transposons não autônomos e sua mobilidade depende da transposase produzida por outros elementos.

Pesquisa de Elementos Transponíveis no fungo fitopatígeno *Colletotrichum sublineolum*

Tabela 1 - Classificação geral dos elementos transponíveis classe I em fungos (Fávaro et al. 2005)

Classe do elemento	Grupo do elemento	Elemento	Fungo Hospedeiro	Referências	
Class I transposons (retroelements)	LTR retrotransposon Metaviridae (<i>gypsy</i>)	<i>foret</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Julien <i>et al.</i> , 1992	
		<i>skippy</i>	<i>F. oxysporum</i>	Anaya and Roncero, 1995	
		<i>grh</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	Dobinson <i>et al.</i> , 1993	
		<i>maggy</i>	<i>M. grisea</i>	Farman <i>et al.</i> , 1996b	
		<i>pyret</i>	<i>M. grisea</i>	Nakayashiki <i>et al.</i> , 2001	
		<i>mgl3</i>	<i>M. grisea</i>	Kang, 2001	
		<i>cft-1</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	McHale <i>et al.</i> , 1992	
		<i>cgret</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Zhu and Oudemans, 2000	
		<i>boty</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Diolez <i>et al.</i> , 1995	
		<i>real</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Kaneko <i>et al.</i> , 2000	
	<i>dane 1, 2</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Nielsen <i>et al.</i> , 2001		
	<i>afut</i>	<i>A. fumigatus</i>	Neuvéglise <i>et al.</i> , 1996		
	<i>mars4</i>	<i>Ascobolus immersus</i>	Goyon <i>et al.</i> , 1996		
	<i>dab1</i>	<i>Neurospora crassa</i>	Bibbins <i>et al.</i> , 1998		
	<i>yeti</i>	<i>Podospora anserina</i>	Hamann <i>et al.</i> , 2000b		
	<i>mary1</i>	<i>Tricholoma matsutake</i>	Murata and Yamada, 2000		
	<i>prt1</i>	<i>Phycomyces blakesleanus</i>	Ruiz-Pérez <i>et al.</i> , 1996		
		LTR retrotransposon Pseudoviridae (<i>copia</i>)	<i>mars 2, 3</i>	<i>A. immersus</i>	Goyon <i>et al.</i> , 1996
			<i>tcen</i>	<i>N. crassa</i>	Cambareri <i>et al.</i> , 1998
			<i>nht2</i>	<i>Nectria haematococa</i>	Shiflett <i>et al.</i> , 2002
	non LTR retrotransposon (<i>LINE</i>)	<i>tad</i>	<i>N. crassa</i>	Kinsey and Helber, 1989	
		<i>mgl</i>	<i>M. grisea</i>	Nishimura <i>et al.</i> , 2000	
		<i>mgr583</i>	<i>M. grisea</i>	Hamer <i>et al.</i> , 1989	
		<i>cgt1</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	He <i>et al.</i> , 1996	
		<i>mars1</i>	<i>A. immersus</i>	Goyon <i>et al.</i> , 1996	
		<i>mary2</i>	<i>T. matsutake</i>	Murata <i>et al.</i> , 2001	
	non LTR retrotransposon (<i>SINE</i>)	<i>nrs1</i>	<i>N. haematococca</i>	Kim <i>et al.</i> , 1995	
		<i>foxy</i>	<i>F. oxysporum</i>	Mes <i>et al.</i> , 2000	
		<i>mgsr1</i>	<i>M. grisea</i>	Kachroo <i>et al.</i> , 1995	
		<i>egr1</i>	<i>Erysiphe graminis</i>	Wei <i>et al.</i> , 1996	
		<i>egh1</i>	<i>E. graminis</i>	Rasmussen <i>et al.</i> , 1993	

Tabela 2 – Classificação geral dos elementos transponíveis classe II em fungos (Fávaro et al. 2005)

Classe do elemento	Grupo do elemento	Elemento	Fungo Hospedeiro	Referências	
Class II transposons (DNA mediated elements)	<i>Tc1/Mariner</i>	<i>fot1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Daboussi <i>et al.</i> , 1992	
		<i>impala</i>	<i>F. oxysporum</i>	Langin <i>et al.</i> , 1995	
		<i>fot2</i>	<i>F. oxysporum</i>	Daboussi and Langin, 1994	
		<i>fot3;fot4</i>	<i>F. oxysporum</i>	Hua-van <i>et al.</i> , 2000	
		<i>punt</i>	<i>Neurospora crassa</i>	Margolin <i>et al.</i> , 1998	
		<i>flipper</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Levis <i>et al.</i> , 1997	
		<i>tan1</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Nyssonen <i>et al.</i> , 1996	
		<i>vader</i>	<i>A. niger</i>	Amutan <i>et al.</i> , 1996	
		<i>ant1</i>	<i>A. niger</i>	Glazyer <i>et al.</i> , 1995	
		<i>pot2</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	Kachroo <i>et al.</i> , 1994	
		<i>mgr586</i>	<i>M. grisea</i>	Farman <i>et al.</i> , 1996a	
		<i>fcc1</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Panaccione <i>et al.</i> , 1996	
		<i>nht1</i>	<i>Nectria haematococa</i>	Enkerli <i>et al.</i> , 1997	
		<i>pat</i>	<i>Podospora anserina</i>	Hamann <i>et al.</i> , 2000a	
		<i>hupfer</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Maurer <i>et al.</i> , 1997	
		<i>pce1</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Gaskell <i>et al.</i> , 1995	
		<i>hAT</i>	<i>restless</i>	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Kempken and Kück, 1996
			<i>folyt</i>	<i>F. oxysporum</i>	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 1999
	<i>tfo1</i>		<i>F. oxysporum</i>	Okuda <i>et al.</i> , 1998	
	<i>hornet1,2,3</i>		<i>F. oxysporum</i>	Hua-Van <i>et al.</i> , 2000	
	<i>palm</i>		<i>F. oxysporum</i>	Mouyna <i>et al.</i> , 1996	
	<i>crypt1</i>		<i>Cryphonectria parasitica</i>	Linder-Basso <i>et al.</i> , 2001	
	<i>ascot</i>		<i>Ascobolus immersus</i>	Colot and Rossignol, 1995	
	<i>tasco</i>		<i>A. immersus</i>	Goyon <i>et al.</i> , 1996	
	<i>scooter</i>		<i>Schizophyllum comune</i>	Fowler and Mitton, 2000	
	<i>abr1</i>		<i>Agaricus bisporus</i>	Sonnenberg <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Mutator</i>	<i>hop</i>	<i>F. oxysporum</i>	Chalvet <i>et al.</i> , 2003	
		<i>MITE</i>	<i>mimp</i>	<i>F. oxysporum</i>	Hua-van <i>et al.</i> , 2000
	<i>guest</i>		<i>N. crassa</i>	Yeadon and Catcheside, 1995	

Existem estratégias que permitem a detecção, isolamento e caracterização dos elementos transponíveis em fungos. Kempken e Kuck (1998) citam as quatro estratégias utilizadas no isolamento desses elementos em fungos: 1) Identificação e clonagem de seqüências repetidas dispersas no genoma, sendo esta particularmente utilizada para identificação de transposons com grande número de cópias no genoma; 2) Inativação espontânea de genes clonados – empregada quando se deseja isolar elementos ativos no genoma e quando se conhece genes cujo fenótipo mutado pode ser facilmente selecionado; 3) construção de oligonucleotídeos degenerados de seqüências conservadas, tais como transposase (transposons) e transcriptase reversa (retrotransposons) – permite a análise rápida de grande número de elementos; 4) uso de sondas heterólogas – usada na procura de elementos conhecidos.

Uma série de trabalhos tem relatado o impacto que esses elementos causam no genoma de fungos e seus diversos efeitos mutagênicos. Dentre esses, destacam-se o trabalho de Kang et al. (2001) que observaram surgimento de virulência causada pela inserção do transposon *Pot 3* em um gene de avirulência de *Magnaporthe grisea*. Deschamps et al. (1999) observaram ativação e alteração transcricional do gene *nia D* de *F. oxysporum* devido à inserção do elemento *Fot 1* no íntron deste gene. Davière et al. (2001) observaram que o alto grau de polimorfismo cromossômico em *F. oxysporum* era devido a altas densidades de elementos transponíveis.

Um outro trabalho que se destaca foi feito por Chiocchetti *et al.*(1999). Estes autores detectaram a presença do fungo *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* em tecidos da flor do cravo, através da amplificação dos elementos transponíveis *Fot1* e *Impala*. Estes elementos pertencem à classe II e o esquema de representação geral destes elementos é mostrado na figura 4.

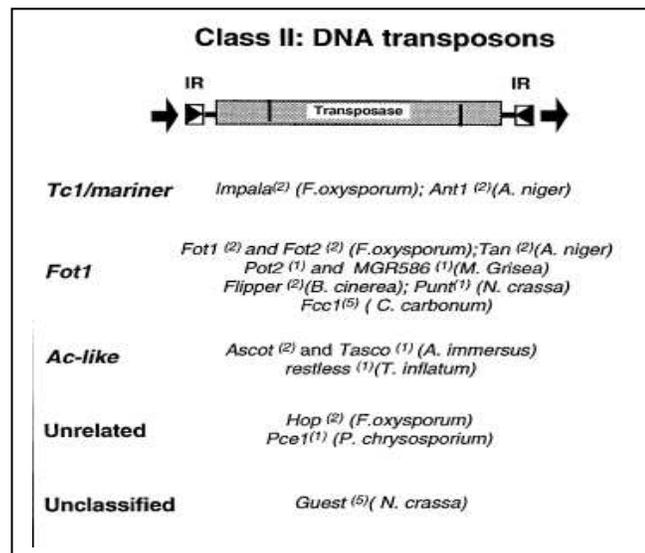


Figura 4. Esquema geral dos transposons *Fot 1* e *Impala* mostrando a posição das IRs (repetições invertidas) terminais e do gene que codifica para transposase, enzima que atua no processo de transposição (Chiocchetti *et al.*,1999).

São poucos os trabalhos com o objetivo de se conhecer elementos genéticos móveis presentes no genoma de *Colletotrichum*. O primeiro elemento transponível descrito no gênero *Colletotrichum* foi o CgT1 (He *et al.*, 1996). Ele foi encontrado em um estudo de identificação de duas linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* que causam diferentes antracoses em leguminosa. Este

elemento possui 5.7 Kb de tamanho, está presente em 30 cópias no genoma, contém ORFs que codificam proteínas Gag, transcriptase reversa e RNase H e não possui LTRs. Estas características indicam que o CgT1 pertence à classe de retrotransposons sem LTR, conhecidos como LINE e encontrados no genoma de eucariotos. Zhu e Oudemans (2000) identificaram um retrotransposon em *C. gloeosporioides*, fitopatógeno de groselheira, através de clonagem e sequenciamento de seqüências repetidas. Inicialmente, os autores isolaram o DNA do fungo, clivaram e construíram uma biblioteca genômica. Isolaram 8 clones contendo insertos de diferentes tamanhos, os quais foram usados em reações de *Southern blot* na busca de sinais fortes de hibridização. A partir daí fizeram o sequenciamento e desenhos de *primers* (iniciadores) das regiões repetidas. Este retrotransposon foi caracterizado como pertencente à família *gypsy* e foi designado *Cgret*. O elemento *Cgret* é um retrotransposon com LTR (longas repetições terminais) e possui o tamanho de 7916 pb. As LTRs estão dispostas em ambas as extremidades e possuem tamanho de 544 pb cada uma. Estas seqüências foram obtidas através de purificação, clonagem e sequenciamento de produto de PCR. Os primers foram sintetizados tendo como base a alta conservação das LTRs. Os autores detectaram este elemento em diversas linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Quando se iniciou este trabalho, não havia na literatura qualquer descrição de elementos transponíveis em *C. sublineolum*. Apenas recentemente, Crouch et al. (2007) tornaram público o isolamento de TEs em *C. cereale* e a presença de

elementos semelhantes em *C. sublineolum*. Neste trabalho, os autores construíram uma biblioteca de DNA genômico. A triagem desta biblioteca foi feita por um sistema de sondagem no qual são utilizados DNA genômico marcado radioativamente. Os clones possuindo fortes sinais de hibridização foram seqüenciados. O elemento denominado *Cosret1*, de *C. sublineolum*, foi encontrado através de PCR utilizando-se primers desenhados a partir das seqüências repetidas obtidas nos trabalhos com *C. cereale*. Este elemento foi caracterizado como sendo um retrotransposon com LTR pertencente à família *Metaviridae*.

Considerando a escassez de trabalhos relacionando a ocorrência de TEs e variabilidade genética em *C. sublineolum* foi proposto pesquisar a presença desses elementos no sentido de se decifrar a causa da grande variabilidade neste fitopatógeno.

2 OBJETIVOS

- ✓ Tendo em vista a possibilidade de que elementos transponíveis possam contribuir para a variabilidade genética em *C. sublineolum*, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de elementos transponíveis neste fungo utilizando primers descritos para amplificação desses elementos em outras espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *C. sublineolum* e condições de cultivo

Os isolados de *C. sublineolum* utilizados neste trabalho são provenientes da Embrapa Milho e Sorgo de Sete lagoas – MG. Os 24 isolados, cedidos pelo Dr. Carlos Roberto Casela, foram obtidos a partir de folhas de sorgo com sinais de antracnose em quatro regiões brasileiras: Centro-oeste, Nordeste, Sudeste e Sul. A numeração e a procedência de cada isolado estão citadas na Tabela 1. Outras espécies de fungo e bactéria usadas neste trabalho foram representadas apenas por seus DNA fornecidos por outros laboratórios e citadas na Tabela 4.

Tabela 3: Identificação e Procedência dos isolados de *C.sublineolum*

Isolados	Procedência (região)
Cs 01 a Cs 05	Centro-oeste
Cs 06 a Cs 10	Nordeste
Cs 11 a Cs 16	Sudeste
Cs 17 a Cs 24	Sul

Tabela 4: DNAs usados como controle em reações de PCR

Espécie	Procedência
<i>Paracoccidioides brasilienses</i> - Linhagens 01 e 608 - Controle positivo de PCR (DNA)	Dra. Patrícia Cisalpino – Laboratório de Biologia de Microrganismos–Departamento de Microbiologia da UFMG
Linhagens de <i>C. sublineolum</i> e <i>C. cereale</i> - Controle positivo de PCR (DNA)	Dr. Bradley Hillman - Department of Plant Biology and Pathology - Rutgers University
<i>E.coli</i> - Controle positivo de PCR (DNA)	Dra. Andréa Amaral Nascimento - Laboratório de Genética de Microrganismos - Departamento de Biologia Geral - UFMG

Para manutenção dos isolados de *C. sublineolum* foram feitas transferências de fragmentos de micélio para placas de Petri contendo meio FAA (ver seção 3.3.1). As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 25°C, por um período de sete dias. Crescimento para extração de DNA foi feito em meio Sabouraud líquido (ver seção 3.3.4)

3.2 Extração do DNA

Foram utilizados para este trabalho os DNAs dos 24 isolados brasileiros, citados anteriormente, e das linhagens controle. O DNA dos isolados de *C. sublineolum* foi extraído seguindo metodologia descrita por Raeder e Broda (1985),

com modificações. Para a obtenção do micélio para extração de DNA, foram feitos inóculos das linhagens em tubos plásticos contendo 50 mL de meio de cultura Sabouraud líquido, acrescido de tetraciclina. Os tubos foram colocados sob agitação, à temperatura de 25⁰C. Após sete dias de crescimento em meio Sabouraud líquido, o micélio foi filtrado em papel de filtro Whatman número 1 e mantido a – 20⁰ C até o momento da extração.

Para a extração os micélios foram macerados em N₂ líquido. O pó resultante da maceração desses micélios (cerca de 3 mg) foram colocados em tubos Eppendorf (1,5 mL) onde foram adicionados 300µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,2M pH 7,5; NaCl 0,5M; EDTA 0.01M pH 7,5; SDS 1%). Adicionou-se 1 volume de fenol e os tubos foram invertidos para homogeneização. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf por um minuto. O sobrenadante foi transferido para novos tubos aos quais foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1). Em seguida, os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. O sobrenadante foi novamente recuperado e o DNA precipitado com dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, por dois minutos, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscendido em 50µL de Tris-HCl 10 mM contendo RNase (200µg/µL) por duas horas a 37°C e estocado a – 20⁰ C.

3.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho para o crescimento das linhagens de *C. sublineolum* estão listados abaixo.

3.3.1 Meio de farinha de aveia e ágar - FAA

- Farinha de aveia 60,0g
- Agar 15,0g
- Água destilada qsq 1L
- Tetraciclina 1,5 mL

Para o preparo deste meio, os produtos, com exceção da tetraciclina, foram misturados em liquidificador; a solução foi cozida até o ponto de mingau e autoclavada. O antibiótico foi adicionado ao meio após este ter atingido a temperatura de aproximadamente 65^o C (descrito em Valério et al., 2005).

3.3.2 Meio Sabouraud (Líquido) (Pelczar, 1916)

- Peptona 10,0 g
- Glicose 20,0 g
- Água destilada qsp 1 L

Para o preparo deste meio, a peptona e a glicose foram adicionadas à água, homogeneizadas e a solução foi autoclavada.

3.4 Primers e PCR

Inicialmente foram feitas reações de PCR utilizando-se primers (iniciadores) que foram sintetizados para amplificação de elementos transponíveis pertencentes às duas diferentes classes (Tabela 5). Todas as reações foram feitas em termociclador MJ Reserch PT-100 ou Eppendorf Mastercycler®.

A utilização de primers baseados no elemento *Cgret* foi devida ao fato de ele ter sido encontrado em isolados do gênero *Colletotrichum* (Zhu e Oudemans, 2000) e também por serem as LTRs desse elemento altamente conservadas.

Pesquisa de Elementos Transponíveis no fungo fitopatígeno *Colletotrichum sublineolum*

Tabela 5 – Elementos transponíveis pesquisados nos isolados de *C.sublineolum*

Nome do elemento	Classe	Descrito em:	Sequência do <i>Primer</i>	Referência
Cgret	I	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LTR10 5'-TGTTACGACCCGTTATG-3' P23 5'-TGTTACGGTCAGCTATCC-3'	Zhu e Oudemans, (2000)
Fot I	II	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fot1 5' - AGTCAAGCACCCATGTAACCGACCCCCCTGG-3'	Chiocchetti et al. (1999)
Impala	II	<i>Fusarium oxysporum</i>	5'- CAATAAGTTTGAATACA-3'	Chiocchetti et al. (1999)
Ccret 2	I	<i>Colletotrichum sublineolum</i>	Pol 2 F 5` - CAGAGCATGGACCGTACG – 3` Pol 3 R 5` - CAGTACCTTGTGTATGTG -3`	Crouch et al. (2007)
PbRtp 1 e PbRtp2	II	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ORF592- integrase ORF307-proteínas Gag ORF221-transcriptase reversa ORF553-ribonuclease	592 F 5` - GCGGCAGCAGGCAGATGAT – 3` 592 R 5` - CCCCGGGTGGTTGGAATG – 3` 307 F 5` - GGCGATACCTCCTAACAAGACCAA – 3` 307 R 5` - ATCCGGGAGAGCCAGTGTTCAAAT – 3` 221 F 5` - ACATTCGGCAGGGGTTCCATC – 3` 221 R 5` - GGGCCTGCCATCTCACAAT – 3` 553 F 5` - ACCACACGGGCCTTTGAGAACTAC – 3` 553 R 5` - AAGACGGGGGCAAGACAGAGGAGA – 3`	Dra. Patrícia Cisalpino – UFMG (Comunicação Pessoal)
Integron Classe I	-	<i>E.coli</i>	Int 1 F 5` - AAAACCGCCACTGCGCCGTTA- 3` Int R 5` - GAAGACGGCTGCACTGAACG- 3`	Fonseca et al., 2005
-	-	β -tubulina de <i>Colletotrichum graminicola</i>	Tub F 5` - ATCACGCACTCCCTCGGTGG - 3` Tub R 5` - GATACCAGATCGTTCATGTT – 3`	Michele Pena, baseado em sequencias do GenBank

Foram sintetizados dois *primers*, sendo um *forward* denominado LTR10 e um *rever se* denominado P23 descritos para amplificar LTRs do elemento *Cgret* (Tabela 5). Na reação de PCR para amplificação deste elemento foram seguidas as condições descritas por Zhu e Oudemans (2000). A reação foi feita em termociclador MJ Reserch PT-100 da seguinte forma:

- Desnaturação a 93⁰ C, por 1 minuto
- Anelamento dos *primers* a 39⁰ C, por 1 minuto
- Extensão das fitas a 72⁰ C, por 1 minuto e 10 segundos
- Ciclo repetido, por 34 vezes.

Já a utilização de *primers* para amplificação do elemento *Ccret2* foi devido ao fato de ele também ter sido descrito em isolados norte-americanos de *Colletotrichum* (Crouch et al., 2007) e os *primers* terem sido gentilmente fornecidos ao nosso grupo de pesquisa (Tabela 5). As condições usadas na reação estão descritas abaixo:

- Desnaturação a 93⁰ C, por 1 minuto
- Anelamento dos *primers* a 50⁰ C, por 1 minuto
- Extensão das fitas a 72⁰ C, por 1 minuto e 10 segundos
- Ciclo repetido, por 34 vezes

Foram utilizados ainda *primers* baseados na seqüência de elementos transponíveis descritos em *P. brasiliensis* (PbRtp1 e PbRtp2), que foram gentilmente cedidos e amplificam diferentes ORFs (Tabela 3). As condições de

reação foram as mesmas utilizadas para o trabalho em *P. brasiliensis* e seguiram os mesmos parâmetros das reações feitas acima para os elementos *Ccret*.

A utilização de *primers* para amplificação dos elementos *Fot 1* e *Impala* foi devida à alta conservação da seqüência do gene que codifica transposases. Os *primers* referentes a estes elementos (Tabela 5) que foram utilizados neste trabalho foram sintetizados com base naqueles descritos por Chiocchetti *et al.* (1999). Eles representam as ITRs (regiões terminais invertidas) de *Fot1* e *Impala*, respectivamente, e foram utilizados em reações separadas com objetivo de amplificar elementos semelhantes a eles. Para a reação de PCR foram seguidas as condições descritas por Chiocchetti *et al.* (1999).

- Desnaturação a 94⁰ C, por 1 minuto
- Anelamento dos *primers* de 65 a 55⁰ C, por 1 minuto
- Extensão das fitas a 72⁰ C, por 1 minuto
- Ciclo repetido, por 34 vezes

Obs: Os 10 primeiros ciclos tiveram temperaturas de anelamento dos primers (passo 3) decrescendo de 65 a 55° C. Os demais permaneceram na temperatura de anelamento de 55° C. O tempo de anelamento foi de 30 segundos.

Reações com gradiente de temperatura também foram feitas para testar diferentes temperaturas de anelamento. Estas reações seguiram o esquema abaixo:

- Desnaturação a 93⁰ C, por 1 minuto
- Anelamento dos primers (gradiente*), por 1 minuto
- Extensão das fitas a 72⁰ C, por 1 minuto e 10 segundos
- Ciclo repetido, por 34 vezes

* O gradiente de temperatura variou de 42,1 a 55,4^o C: 42,1;42,5; 43,3; 44,5; 46,0; 47,6; 49,3; 50,8; 52,3; 53,4; 54,2; 55,1

As reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi visualizado através de coloração com brometo de etídeo sob luz UV.

3.5 Clonagem e sequenciamento

As reações de PCR que produziram fragmentos foram utilizadas para clonagem dos produtos. Foi utilizado o Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Os produtos de PCR foram ligados ao vetor pCR2-TOPO e uma digestão do vetor com a enzima *EcoRI* foi feita para se verificar a correta inserção, já que esta enzima possui sítios de restrição flanqueando o sítio de inserção. O produto da ligação (vetor + inserto) foi introduzido, por eletroporação, em *Escherichia coli DH5α* eletrocompetente, para a obtenção de clones. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit DYEnamic ET Terminator (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Após a reação de

sequenciamento, os produtos foram purificados seguindo protocolo de precipitação padrão de etanol/acetato de amônio. O sequenciamento foi realizado em um Megabace 1000 automatic DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech), no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular, no Departamento de Biologia Geral da UFMG.

3.6 Análise de seqüências de DNA

As seqüências obtidas por sequenciamento de DNA foram analisadas com o programa Phred v. 0.20425 (Ewing et al., 1998), responsável pelo *base calling* das seqüências. Em seguida, estas seqüências foram alinhadas para produzir uma única seqüência consenso por meio dos programas Phrap v. 0.990319 (<http://phrap.org>) e Consed 12.0 (Gordon et al., 1998). A seqüência consenso obtida foi utilizada para verificar, por meio do programa BlastX (Altschul, 1997), possíveis seqüências homólogas depositadas no banco de dados do GenBank.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde que foram descobertos, na década de 1940, por Bárbara McClintock, os elementos transponíveis têm sido descritos e caracterizados nos diversos seres vivos. Em fungos eles foram descritos primeiramente em *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke (1989), citado em Fávares et al., 2005). A partir de então uma série de trabalhos têm sido feitos e vários elementos já foram descritos em fungos (Tabelas 1 e 2).

A identificação destes elementos tem sido feita usando diferentes estratégias (Kempken e Kuck, 1998): identificação e clonagem de seqüências repetidas dispersas no genoma; inativação espontânea de genes clonados; construção de oligonucleotídeos degenerados de seqüências conservadas, tais como transposase (transposons) e transcriptase reversa (retrotransposons); uso de sondas heterólogas.

Neste trabalho, foram usados inicialmente *primers* para amplificação de elementos das classes I e II, descritos anteriormente no gênero *Colletotrichum* e outros (Tabela 5). Para amplificação de elementos descritos em *C. gloeosporioides* (*Cgret*) foram feitas reações nas mesmas condições daquelas descritas nos respectivos trabalhos (Ver Material e Métodos). Nos isolados de *C. sublineolum* estudados (Tabela 3) não foram observadas amplificações com os pares de primers desse elemento que pudessem indicar a sua presença. As reações foram repetidas três vezes com um número menor de isolados e o resultado não se alterou. Como não se possuía o DNA da linhagem na qual este

elemento foi encontrado (Zhu e Oudemans, 2000), não foi feito um controle positivo nessas reações. Para contornar a possibilidade de que a ausência de bandas pudesse ser devida a problemas no DNA, foi feita uma reação de PCR utilizando primers para o gene da β -tubulina de *Colletotrichum* para se verificar a sua integridade. A Figura 5 mostra o resultado dessa reação para uma amostra de isolados onde foi detectado o fragmento de tamanho esperado para aquele par de primers (500pb). Foi verificado que o DNA dos isolados estava íntegro e apropriado para a PCR, autenticando a negatividade da PCR com aqueles primers de *Cgret*.

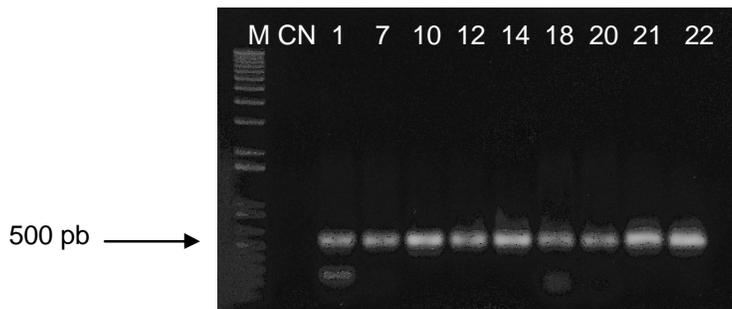


Figura 5 – Gel de agarose contendo as amplificações geradas em isolados de *C. sublineolum* por PCR com primers para amplificação do gene β -tubulina. M – Marcador 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN - controle negativo; *C. sublineolum*-1,7,10,12,14,18,20,21,22 – Isolados de *C. sublineolum*.

Zhu e Oudemans (2000) observaram que o elemento *Cgret* estava presente apenas em isolados oriundos de New Jersey e Massachusetts, mas não em isolados de Wisconsin e do Chile. Verificaram ainda que também havia polimorfismos entre os elementos isolados de *C.gloeosporioides* de diferentes

culturas quando fizeram o *fingerprint* utilizando os fragmentos correspondentes às LTRs, obtidos por reações de PCR, como sonda.

Para pesquisar a presença do elemento *Ccret 2*, descrito em isolados de *C. cereale* e *C. sublineolum* norte-americanos (Crouch et al., 2007), nos isolados brasileiros, foi feita uma reação de PCR utilizando os primers pol2F e pol3R. Neste experimento foi utilizado como controle positivo o DNA de *C. cereale* PA-50231, linhagem na qual foi detectado esse elemento transponível. Nenhum dos isolados brasileiros apresentou amplificação correspondente a este elemento (Figura 6). As reações foram repetidas três vezes com uma amostra menor e aleatória dos isolados. Também foram testadas outras temperaturas de anelamento utilizando PCR com gradiente de temperatura variando entre 42 e 55° C, com nenhum sucesso na geração de amplicons.

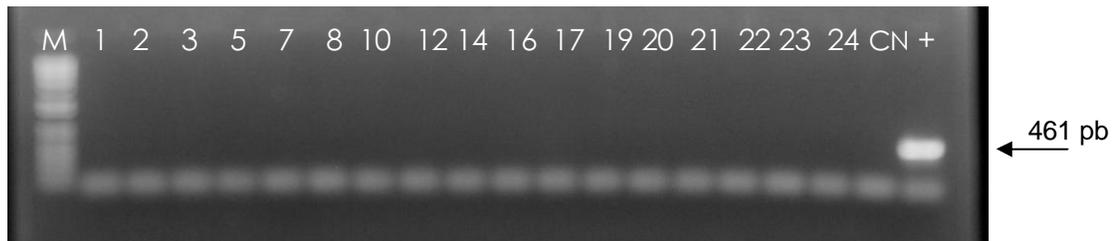


Figura 6 – Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com primers para amplificação do elemento *Ccret 2*. M- Marcador molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); 1 ao 24 – isolados de *C. sublineolum*; + controle positivo (DNA PA-50231); CN- Controle negativo.

Em um isolado de *C. sublineolum* norte-americano foi encontrado um retrotransposon denominado *Cosret* utilizando-se primers para amplificação do elemento *Ccret* (Crouch et al., 2007). Isto mostra que é possível um elemento

transponível estar presente em isolados de espécies diferentes do mesmo gênero. Nossos resultados sugerem que elementos relacionados a *Cosret* estão ausentes nesses isolados de *C. sublineolum* brasileiros. É possível ainda que tais elementos estejam presentes e devido a eventos de deleção e mutação nos sítios de anelamento dos primers utilizados, a amplificação não foi possível. Crouch et al. (2007) detectaram eventos de mutação típicos de RIP (Repeat-Induced Point Mutation) nos TEs de diversas linhagens de *C. cereale*.

Da mesma forma que nas PCRs com primers para *Cgret* e *Ccret*, quando se usou primers dos elementos classe I *Fot1* e *Impala* não se obteve amplificação em nossos isolados de *C. sublineolum*. As reações também foram repetidas três vezes. Além disso foi feita uma outra reação de PCR utilizando-se, desta vez, um gradiente de temperatura de anelamento variando de 42 a 55° C, com os pares de primers descritos para os elementos *Fot1* e *Impala*. Em nenhuma reação foram detectadas amplificações. Chiocchetti et al. (1999) pesquisaram a presença destes elementos em 72 isolados de *F. oxysporum* provenientes da Itália, Israel, Colômbia, Nova Zelândia e Japão. Em todos os isolados pesquisados foram encontrados tais elementos. Zanotti et al. (2005), estudando a distribuição do elemento *Impala* em 20 isolados de *F. oxysporum*, verificaram a presença deste elemento na grande maioria dos isolados usando PCR com primers específicos para sua amplificação. No entanto, um dos isolados, *Fus 4*, não possuía cópia alguma do elemento. Os autores também observaram que *Impala* é um antigo componente no genoma de *F. oxysporum*, pois observaram a presença de

diferentes subfamílias dentro do mesmo genoma, diferentemente dos elementos *Cgret* e *Ccret* (encontrado apenas em isolados de algumas localidades), o que pode indicar uma diferente história evolutiva neste gênero (Crouch et al., 2007).

Uma outra alternativa na busca por elementos transponíveis no genoma de *C. sublineolum* foi a utilização de primers para o gene da integrase de *E.coli*. Esta tentativa foi feita pelo fato de o gene da integrase estar presente tanto em integrons quanto em retrotransposons descritos em uma grande variedade de fungos (Tabela 1). Embora possa não haver grande homologia entre esses genes, a reação foi feita devido ao fácil acesso aos primers, já que eles vinham sendo usados em um estudo de integro ns classe I em bactérias no Laboratório de Genética de Microrganismos (Flaviane Alvarenga e Andrea Amaral, comunicação pessoal). Inicialmente, utilizaram-se apenas dois isolados nas reações para verificar se haveria a amplificação de algum fragmento que pudesse ser pesquisado; em caso afirmativo, as reações seriam feitas com os outros isolados. Em *E. coli*, a amplificação do gene da integrase gera um fragmento de 1200 pb. Com o DNA de *C. sublineolum* houve amplificação de várias bandas, inclusive com tamanho próximo à banda do controle positivo (1200pb); uma banda de maior intensidade foi vista, com aproximadamente 400 pb (Figura 7). O perfil de amplificação foi igual nos dois isolados pesquisados.

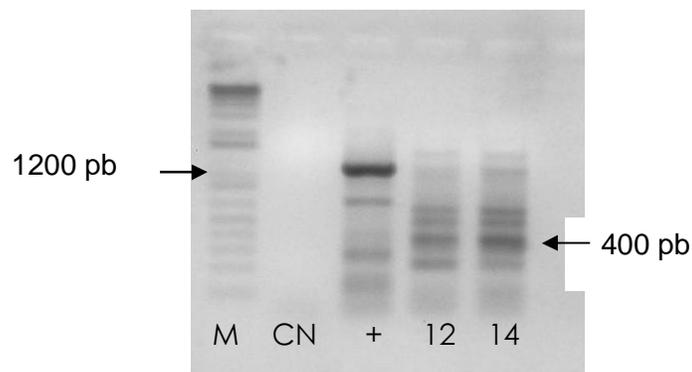


Figura 7 – Gel de agarose contendo as amplificações geradas em isolados de *C. sublineolum* por PCR com *primers* para amplificação do gene da integrase de *E. coli*. M - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN- Controle negativo; (+) controle positivo (DNA de *E. coli*); Cs 12 e 14 – Isolados de *C. sublineolum*.

Nas reações utilizando-se o DNA de todos os isolados observou-se que o fragmento de 400 pb estava presente em todas as amostras e que havia forte sinal de amplificação quando comparado com o controle positivo. Quando foi feita a reação de PCR com esses mesmos *primers* com temperatura de anelamento de 59°C observou-se que houve uma diminuição no número de fragmentos amplificados e que os fragmentos com 400 e 1200pb permaneciam. Por isso, fez-se uma outra reação de PCR usando apenas um dos *primers* do par para verificar se as bandas apresentadas não eram devidas ao anelamento dos primers em regiões diferentes do genoma. O resultado desta reação mostrou que os fragmentos de 1200 e 400 pb correspondiam ao anelamento de *primers* isolados *forward* e *reverse*, respectivamente (Figura 8), e que a amplificação da banda que foi clonada e seqüenciada poderia ser devida ao anelamento apenas do *primer reverse*. Na expectativa de se encontrar correspondência com elementos de transposição, fez-se a clonagem deste fragmento de 400pb e sequenciamento de

DNA de dois clones provenientes de uma reação. A seqüência obtida de 431 pb mostrou similaridade com seqüências parciais com um integron de *Citrobacter freudi* e *Citrobacter amalonaticus*. A TABELA 6 mostra os resultados para os dois clones com o BLAST, apresentando as seqüências com maior valor *Score*.

Tabela 6 – BLASTN das seqüências dos clones de uma possível integrase

Nº acesso	Identificação	BLASTN		
		Score	E-value	Identidade
AF 458081.1	<i>Citrobacter freudi</i> isolado CF-12 Integron Classe I	117	4e -23	100%
AF 486817.1	<i>Citrobacter amalonaticus</i> isolado CA-1 Integron Classe I	117	4e -23	100%

A pontuação é calculada pela determinação do valor 1 para cada base idêntica e 0 para cada base não idêntica, excluindo os *gaps*. Desta forma, quanto maior o *score* maior será a certeza de que a seqüência de interesse corresponde à do *GenBank*. Já o *E-value* representa o número de identidades no banco de dados de seqüências não-redundantes atuais que é esperado por acaso. Assim, quanto menor este valor maior a probabilidade de que a similaridade seja real (Hall, 2004). Desta forma, pode-se dizer que os valores encontrados (117) são baixos, uma vez que as seqüências que mostraram similaridade possuem 1621 e 1501 pb em *C. freudi* e *C. amalonaticus*, respectivamente. Quando apenas 300 pb internos da seqüência foram utilizados no blasto os ITRs foram de *score* bastante baixos, mas indicando semelhança com proteínas fônicas de função ainda desconhecida

(Tabela 7). Assim, a amplificação não corresponderia a genes da integrase esperada, mas sim de seqüências aleatórias do genoma. Isto explicaria o baixo score encontrado na busca do BLASTX.

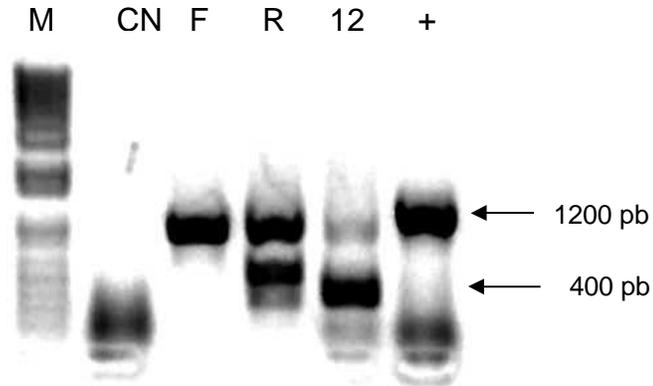


Figura 8 - Gel de agarose contendo as amplificações geradas em isolados de *C. sublineolum* por PCR com *primers* para amplificação do gene da integrase de *E. coli*. M - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN- Controle negativo; F – reação com o primer foward apenas; R- reação com o primer *reverse* apenas; 12- Isolado de *C. sublineolum* ; + controle positivo (DNA de *E. coli*).

Tabela 7 – BLASTX das seqüências dos clones de uma possível integrase

Nº acesso	Identificação	BLASTN	
		Score	E-value
XP_749885.2	Proteína conservada hipotética de <i>Aspergillus</i>	42	0,013
XP_682423.1	Proteína hipotética de <i>Aspergillus</i>	39,7	0,063
XP_001396091.1	Proteína hipotética de <i>Aspergillus</i>	38.9	0,11

Em um trabalho de doutoramento no Departamento de Microbiologia (Roberta Araújo e Dra. Patrícia Cisalpino - Orientadora) foi detectada a presença de possíveis elementos transponíveis em dois isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, através de levantamento das seqüências que apresentavam similaridade com proteínas codificadas por elementos genéticos móveis, feito no Banco de Dados do Projeto Genoma Diferencial e Funcional do *P. brasiliensis*. Sabendo-se que os elementos possuíam características de retrotransposons utilizou-se no presente trabalho o DNA de *P. brasiliensis* (01 e 608) para testar se os primers poderiam amplificar tais elementos, e também para testar diferentes primers para ORFs de TEs encontrados naquela espécie com o DNA de *C. sublineolum*.

Todos os pares de primers propostos para o estudo em *C. sublineolum* foram utilizados com o DNA de *P. brasiliensis*. Para essas reações foram usadas apenas as condições descritas nos artigos que descreveram os respectivos elementos. As reações com os primers LTR e P23 foram feitas com temperatura de anelamento de 39°C, como descrito para *Cgret*. Foram utilizados os DNAs das linhagens 01 e 608 de *P. brasiliensis*. Somente quando se utilizou os primers LTR/P23 para amplificação das LTRs do elemento *Cgret* com o DNA de *P. brasiliensis* foi possível obter amplificações. As reações com os demais pares de primer não geraram sinais de amplificação (Figura 9). Foram feitas duas reações controle dos primers, cada uma contendo apenas o primer LTR ou o P23, onde foram geradas várias bandas. Observou-se que um fragmento de 1200 pb

corresponde ao anelamento de apenas um dos *primers* LTR ou P23 e que aparece quando o par é utilizado. Um fragmento de 850 pares de base aparece apenas quando o par é usado na reação.

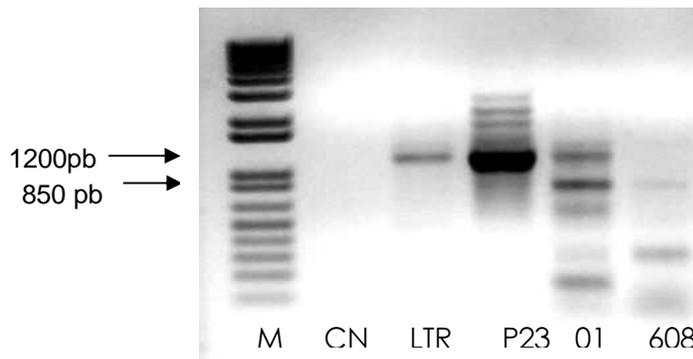


Figura 9 – Gel de agarose contendo as amplificações geradas em isolados de *P. brasiliensis* por PCR com primers para amplificação de LTR do elemento *Cgret*. M - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN- Controle negativo; LTR e P23 – primers forward e reverse utilizados separadamente e com DNA do

Como a temperatura de anelamento foi baixa neste experimento, uma outra reação de PCR foi feita com os primers LTR e P23 numa tentativa de diminuir qualquer inespecificidade. Nesta reação variou-se a temperatura de anelamento dos primers. A variação foi de 42,1 a 54,2° C (Figura 10). Observou-se que mesmo em temperaturas de anelamento mais elevadas (50,8), em comparação com aquela descrita no trabalho que descreve o elemento *Cgret* (39° C), a banda de aproximadamente 850pb estava presente. A caracterização deste fragmento

poderá indicar sua relação com LTRs dos elementos PbRtp1 e PbRtp2 de *P. brasiliensis*. Ainda é possível que as bandas de 1200 pb sejam resultado da amplificação de elementos em tandem, pois esta banda poderá ser o resultado da ação em conjunto do *primer* LTR de um elemento e o P23 do elemento seguinte.

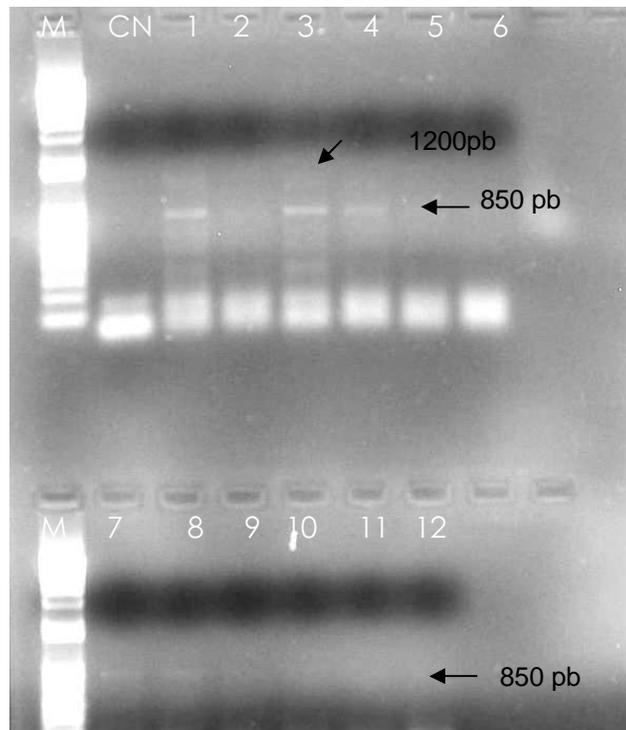


Figura 10 – Gel de agarose contendo as amplificações geradas no isolado 01 de *P. brasiliensis* por PCR com *primers* para amplificação das LTRs do elemento *Cgret* de *C. gloeosporioides*. M - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN- Controle negativo; 1 a 12 – temperaturas de anelamento: 42,1;42,5; 43,3; 44,5; 46,0; 47,6; 49,3; 50,8; 52,3; 53,4; 54,2; 55,1)

Os experimentos feitos com os primers descritos para amplificação das diferentes ORFs em *P. brasiliensis* não faziam parte da proposta inicial deste trabalho mas a possibilidade de encontrar ORFs de TEs (e não apenas LTRs) em

C. sublineolum encorajou a fazer esse teste. As reações foram feitas com primers sintetizados para amplificação das ORFs correspondentes à integrase, ribonuclease, transcriptase reversa e proteínas Gag (Roberta Araújo e Dra. Patrícia Cisalpino, comunicação pessoal). As condições foram as mesmas utilizadas nos experimentos com *P. brasiliensis*, cujo DNA foi, em todas as reações, usado como controle positivo. DNAs de uma amostra de nossa coleção de *C. sublineolum* foram utilizados nas reações. Amplificações com os primers específicos para ribonuclease, transcriptase reversa e proteínas Gag não foram observados. No entanto, uma banda de aproximadamente 500pb e outra de aproximadamente 1000pb foram observadas (não mostrado), com os *primers* da integrase. Para verificar se estas bandas não eram devidas ao anelamento isolado dos *primers forward* e *reverse* e para verificar qual temperatura de anelamento seria a melhor, foi feita uma reação de PCR com gradiente de temperatura variando de 40,1 a 51,4° C. A Figura 11 mostra o resultado desta reação. Observou-se que uma banda um pouco menor que 1000pb foi gerada com o *primer forward* apenas. O *primer reverse* gerou duas bandas fracas que não tiveram correspondentes nas outras reações. A banda de aproximadamente 500pb não teve correspondente em nenhuma das bandas geradas por *primers* isolados e se mostrou muito próxima daquela amplificada em *P. brasiliensis*. Este resultado abre a possibilidade de existir elementos transponíveis da Classe I nos isolados estudados.

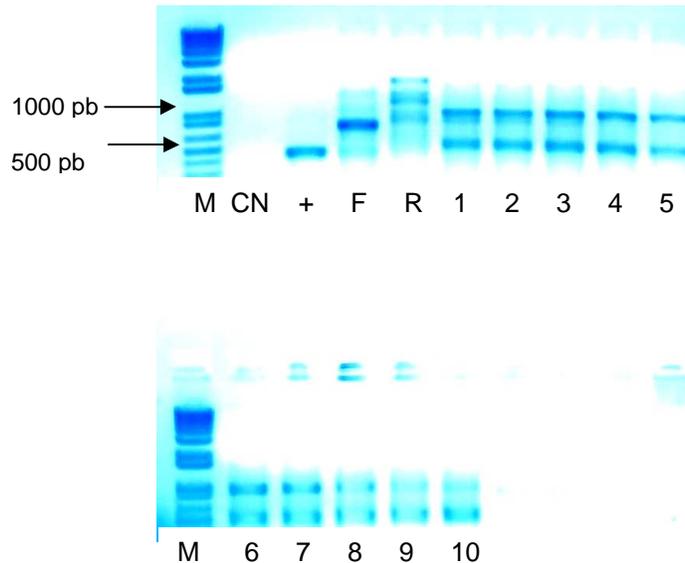


Figura 11 - Gel de agarose contendo as amplificações geradas com DNA do isolado 12 de *C. sublineolum* por PCR gradiente com *primers* para amplificação do gene da ORF da integrase de *P.brasiliensis*. M - Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA); CN- Controle negativo; F – reação com o primer *forward* apenas; R- reação com o primer *reverse* apenas; 1-10– Temperaturas de anelamento: 1-40.1; 2-40.5; 3-41.3; 4-42.5 ;5-44.0; 6-46.0; 7-47.2; 8-48.0; 9-50.2; 10-51.4

O uso de *primers* descritos para amplificação de TEs em outras espécies pode ser uma das maneiras de se detectar estes elementos em diferentes isolados. Crouch et al. (2007) conseguiram identificar um retrotransposon em isolados de *C. sublineolum* utilizando *primer* sintetizados para estudos em *C. cereale*. O estudo aqui iniciado objetivava ter uma visão preliminar da presença de elementos transponíveis em *C. sublineolum* com um método barato e rápido como é a PCR, já que não se dispunha de muitos recursos para essa pesquisa. O método aqui utilizado não permitiu a localização de elementos previamente descritos no gênero *Colletotrichum*, tampouco em *Fusarium*. Uma outra

metodologia para detecção de elementos transponíveis é a inativação espontânea de genes clonados, como por exemplo, o gene da nitrato redutase. Objetivando investigar os mecanismos envolvidos na instabilidade genética de isolados de *C.sublineolum* oriundos de diferentes regiões brasileiras, também cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, MG, Fávares et al. (2007) obtiveram uma série de mutantes resistentes ao clorato; no entanto, verificaram que as mutações não foram devidas à inserção de elementos transponíveis no gene. Desta forma, é possível que uma metodologia mais direcionada, tal como a clonagem e o sequenciamento de seqüências repetidas, como foi feito com os isolados de *C. cereale* (Crouch et al., 2007) e *C. gloeosporioides* (Zhu e Oudemans, 2000) seja necessária para o estudo de TEs no genoma de *C.sublineolum*.

Se por um lado os dados obtidos neste estudo não foram conclusivos quanto à presença de elementos transponíveis nas linhagens de *C. sublineolum* analisadas, a colaboração com o laboratório da Dra. Patrícia Cisalpino abriu uma possibilidade para posteriores investigações acerca de uma possível integração com similaridade com seqüência recém-caracterizada de *P. brasiliensis* (R. Araújo e P. Cisalpino, não publicado). Um próximo passo para continuação desse estudo seria a clonagem e sequenciamento dos fragmentos de 500 e 1000 pb descritos acima. O sequenciamento seria a prova inequívoca da presença de elementos transponíveis já que experimentos de hibridação de DNA em *Southern Blots* não necessariamente indicaria a presença deles se a homologia for pequena. Por outro lado, o sucesso na amplificação de fragmentos de DNA com o uso dos

primers para LTR pode contribuir para a melhor caracterização do retrotransposon de *P. brasiliensis*, já que até o momento uma LTR não havia sido verificada no genoma seqüenciado (R. Araújo e P. Cisalpino, comunicação pessoal).

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a utilização de *primers* para amplificação de elementos transponíveis em outras espécies, embora seja uma maneira rápida e de baixo custo, não é uma metodologia adequada para se concluir sobre a presença destes elementos já que ausência de amplificação pode ser devida a muitos fatores. Outra metodologia deverá ser adotada na tentativa de se isolar e caracterizar os TEs em *Colletotrichum sublineolum*.

A metodologia utilizada neste trabalho é válida para uma triagem inicial de TEs já que em casos de amplificação positiva é possível se iniciar estudos de caracterização, como foi o caso das possíveis LTRs de *P. brasiliensis*.

O sequenciamento de fragmentos obtidos a partir de reações de PCR com *primers* do gene da integrase de *E. coli* não mostra, de maneira conclusiva, que eles sejam parte de seqüências de elementos transponíveis. Já os fragmentos obtidos com *primers* para amplificação da ORF da integrase de *P. brasiliensis*, embora não seqüenciados, servirão de ponto de partida para futuros trabalhos objetivando a caracterização de um possível elemento transponível tipo retrotransposon de *C.sublineolum*.

6 PERSPECTIVAS

A identificação e caracterização de elementos transponíveis em isolados de *C. sublineolum* se faz necessária devido à alta variabilidade do patógeno com relação à sua virulência, pois estes elementos podem ser um dos responsáveis pela dificuldade de controle deste fungo. Desta forma, embora não tenham sido obtidos dados conclusivos da presença dos TEs no genoma dos isolados brasileiros estudados, este trabalho abriu caminho para uma linha de pesquisa com objetivo de conhecer, caracterizar e relacionar a presença destes elementos transponíveis à variabilidade do fungo e sua virulência. Assim, utilizando uma metodologia mais direcionada, será possível afirmar que os fragmentos detectados poderão ser de TEs e, podendo-se caracterizá-los e identificá-los em futuros trabalhos. Além disso, como foi dado o primeiro passo na identificação das LTRs de *P. brasiliensis*, as informações obtidas poderão permitir a caracterização completa dos elementos PbRtp1 e PbRtp2 encontrados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402.

Casela, C.R.; Ferreira, A.S. e Santos, F.G. (2001). Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixture. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 217-219.

Chiocchetti, A.; Bernardo, I.; Daboussi, M.J.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L.; Langin, T. Migheli, Q. (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *dianthi* in Carnation Tissue by PCR Amplification of transposon insertion. *Techniques*, 89: 1169-1175.

Costa, R.V.; Casela, C.R; Zambolim, L.; Ferreira, A.S. (2003). A antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 345-354.

Crouch J. A., Glasheen B. M., Giunta M. A., Clarke B. B., e Hillman B. I. (2007). The evolution of transposon repeat-induced point mutation in the genome of *Colletotrichum cereale*: Reconciling sex, recombination and homoplasmy in an "asexual" pathogen. *Fungal Genet Biol*. Acesso online apenas.

Daboussi, M.J. (1997). Fungal transposable elements and genome evolution. *Genética*. 100: 253-260.

Daboussi, M.J.; Capy, P. (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol*, 57: 275-299.

Davière, J.M.; Langin, T.; Daboussi, M.J. (2001). Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genetics Biol.*, 34: 177-192.

Deschamps, F.; Langin, T.; Maurer, P.; Gerlinger, C.; Felenbok, B.; Daboussi, M.J. (1999). Specific expression of the *Fusarium* transposon *Fot1* and effects on target gene transcription. *Mol. Microbiol.* 31:1373-1383.

Ewing B., e Green P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8: 186-94.

FAO. (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org.

Fávaro, C.L.F, Araújo, W. L., Azevedo, J. L., Paccola-Meirelles, L. D. (2005). The Biology and potencial for genetic research of transposable elements in filamentous fungi. *Genetics and molecular biology* 28: 804-813

Favaro, L. C. F., Araujo, W. L., Souza-Paccola, A. E., Azevedo J.L., e Paccola-Meirelles L. D. (2007). *Colletotrichum sublineolum* genetic instability assessed by mutants resistant to chlorate. *Mycol Res* 111: 93-105.

Finnegan, D.J. (1989). Eucaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5: 103-107.

Fonseca E. L., Vieira V. V., Cipriano R., e Vicente A. C. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 303-9.

Gordon D., Abajian C., e Green P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8: 195-202.

Hall, B.G. (2004). *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*, 2nd ed (196 pp). Massachusetts: Sinauer Associates

He, C., Nourse, J.P., Kelemu, S., Irwin, J.A., Manners, J.M. (1996). CgT1: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol Gen Genet.* 13: 320-31.

IBGE. (2006). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. www.ibge.gov.br

Kang, S.; Lebrun, M.H.; Farral, L.; Valent, B. (2001). Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 671-674.

Kempken F., e Kuck U. (1998). Transposons in filamentous fungi--facts and perspectives. *Bioessays* 20: 652-9.

Leslie, J.F. (2002). Sorghum and Millets Diseases. *Iowa State Press*. Ames, Iowa. 504 pp.

Moore-Landecker, E. (1996). Fundamentals of the fungi. 4th ed. New Jersey. *Rowan College of New Jersey*

Pelczar, M. J. (1916). *Microbiologia* (566p). São Paulo: McGraw-Hill do Brasil.

Raeder, U. e Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Let. Appl. Microbiol.* 1: 17-20

Rosewich, U. L., Pettyway, R. E., McDonald, B. A., Duncan, R. R., Frederiksen, R. A. (1998). Genetic structure and temporal dynamics of a *Colletotrichum graminicola* population in a sorghum disease Nursery. *Ecology and Population Biology.* 88: 1087-1093

Sherrif, C.; Whelan, M.J.; Arnold, G.M.; Bailey, J.A. (1995). rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. *Mycological Research.* 99: 475-478.

Vaillancourt, L.J.; Hanau, R.M. (1992). Genetics and morphological comparisons of *Glomerella* (*Coletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Exp. Mycol.* 16: 219-229

Valerio, H. M., Resende, M. A., Weikert-Oliveira, R. C. B., Casela, C. R. (2005). Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. *Mycopathologia* 159: 449-459

Zanotti, M. G. S., Santos, J. K., Reis, K. C. P., Araújo, E. F., Dhingra, O. D. E Queiroz, M. V. (2005). Distribuição do Elemento Transponível *Impala* em isolados de *Fusarium oxysporum* Patogênicos e Não-Patogênicos ao Feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 30: 244-249

Zhu, P.; Oudemans, P.V. (2000). A long terminal repeat retrotransposon *Cgret* from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. *Curr. Genet.* 38: 241-247.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)