

ANA PAULA MORAIS MARTINS ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL *BOTO* EM
Moniliophthora perniciosa, AGENTE CAUSAL DA VASSOURA-DE-
BRUXA NO CACAUEIRO (*Theobroma cacao*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

ANA PAULA MORAIS MARTINS ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL *BOTO* EM
Moniliophthora perniciosa, AGENTE CAUSAL DA VASSOURA-DE-
BRUXA NO CACAUEIRO (*Theobroma cacao*)**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2009

Prof^a Elza Fernandes de Araújo

Prof^a Denise Mara Soares Bazolli

Prof Sérgio H. Bromoschenkel

Dr^a Irene da Silva Coelho

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

Aos meus pais, Hugo e Teresa Cristina,
Aos meus irmãos, Luiz Gustavo e Raíssa,
Com amor,
Ofereço!

Ao meu amor, Wagner
Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve comigo durante toda minha caminhada,

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e a Capes pela oportunidade e pelo apoio financeiro

À minha orientadora Prof^a Marisa Vieira de Queiroz pelos ensinamentos e orientação durante a execução deste trabalho,

Às minhas co-orientadoras, Prof^a Denise Mara Soares Bazzoli e Prof^a Elza Fernandes de Araújo pelo auxílio e ensinamentos,

Ao professor Sérgio Hérmino Bromoschenkel e a Irene da Silva Coelho por aceitarem o convite de participar da banca e pela contribuição dada,

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia pela eficiência na realização dos seus trabalhos e, principalmente, pela amizade,

A todos meus colegas e companheiros de laboratório, Ana Andréia, Ana Angélica, Andréia, Carolina, Daniel, Emilene, Fábio, Franciso, Irene, Jaqueline, Leandro, Leonardo, Mariana, Mariane, Marina, Mateus, Maycon, Rafael, Swiany pela amizade, companheirismo e dicas de trabalho,

Aos grandes amigos, Alexandra, Guilherme, Janaína e Juline sem os quais estes dois anos de mestrado não seriam tão proveitosos,

As minhas amigas de república Josiane, Melissa e Vanessa, por sempre terem estado ao meu lado e serem o motivo pelo qual nossa casa é meu lugar preferido em Viçosa. Foi muito bom conviver com vocês,

Ao Rodrigo e José Angelo, pela amizade e momentos de descontração,

À Isis e Ramon, pela amizade, chocolates e momentos de descontração,

Aos meus pais, Hugo e Teresa Cristina e meus irmãos, Luiz Gustavo e Raíssa, pelo apoio incondicional em todos os aspectos e sem os quais eu não chegaria até aqui,

À minha avô, tios e primos, pelo apoio constante,

Ao meu namorado, Wagner, pela paciência, apoio e carinho. Sem a sua companhia não seria a mesma coisa. Obrigada por tudo!

À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. <i>Moniliophthora perniciosa</i>	02
2.2. Elementos Transponíveis	03
2.3. Elementos Transponíveis Classe II	05
2.4. Elemento Transponível <i>Boto</i>	14
2.5. Elementos Transponíveis e Genoma do Hospedeiro	16
2.6. Estresse e Elementos Transponíveis	18
2.7. Aplicações dos Elementos Transponíveis	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Microrganismos e Condições de Cultivo	22
3.2. Extração de DNA.....	23
3.3. Oligonucleotídeos	24
3.4. Análise por PCR (Polimerase Chain Reaction) para a Detecção de Sítios de Inserção.....	25
3.5. Clonagem e Sequenciamento.....	25
3.6. Análise do Perfil de Integração de <i>Boto</i>	26
3.7. Extração de RNA Total e RT-PCR.....	26
3.8. Análise da seqüência da ORF 1 presente em <i>Boto</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

ALMEIDA, Ana Paula Morais Martins, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Caracterização do elemento transponível *Boto* em *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro (*Theobroma cacao*)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Orientadoras: Denise Mara Soares Bazzolli e Elza Fernandes de Araújo.

O basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro (*Theobroma cacao*) apresenta diferentes elementos transponíveis em seu genoma. Um elemento transponível da Classe II pertencente à superfamília *PIF/Harbinger*, denominado *Boto*, foi parcialmente caracterizado em estudos anteriores. O elemento *Boto*, assim como os demais elementos *PIF/Harbinger*, apresenta duas ORFs (Open Reading Frame), uma que codifica a transposase e outra, denominada ORF 1, cuja seqüência de aminoácidos deduzida representa uma proteína de função desconhecida. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de comprovar a atividade de *Boto* e caracterizar a ORF 1. Para a confirmação da atividade do elemento transponível *Boto* no genoma de *M. perniciosa* realizou-se a avaliação do perfil de integração em isolados resultantes do ciclo sexual, isto é, obtidos a partir da germinação de basidiósporos. Três isolados apresentaram variação no número de cópias, demonstrando a atividade de *Boto*. Foi realizado PCR para detecção dos sítios de inserção deste elemento em diferentes isolados. Dentre os 28 isolados utilizados no experimento, 14 apresentaram produtos de amplificação com o tamanho esperado. Os produtos de amplificação de dois isolados, escolhidos aleatoriamente, foram clonados e seqüenciados. Na análise das seqüências obtidas, verificou-se que, em ambos os isolados seqüenciados, o elemento *Boto* provavelmente não sofreu transposição para os sítios analisados no genoma de *M. perniciosa*. Isto comprova a atividade deste elemento, pois, no isolado usado como referência para este estudo, o elemento *Boto* estava inserido naquela posição. Na análise da seqüência da ORF 1, verificou-se a presença de dois possíveis íntrons, um contendo 55 pb e outro de 48 pb. Esta seqüência codifica uma proteína de 422 resíduos de aminoácidos. Para comprovar a presença dos íntrons, experimentos de RT-

PCR foram realizados com a utilização de dois conjuntos de oligonucleotídeos. Os amplificadores obtidos, quando cDNA foi utilizado como molde da reação de PCR, foram clonados e sequenciados, sendo confirmada a posição e o tamanho dos dois íntrons preditos. Análise de RT-PCR mostrou que esta ORF é expressa mesmo em condições normais de cultivo do fungo, o que é importante para atividade deste elemento, visto que outros estudos mostram que a expressão desta ORF é fundamental à transposição de elementos *PIF/Harbinger*. Os resultados deste trabalho mostram que *Boto* é ativo no genoma de *M. perniciososa* e pode ter um importante papel como agente gerador de variabilidade genética neste fitopatógeno. Vale ressaltar que esta é a primeira descrição de um elemento da superfamília *PIF/Harbinger* que apresenta dois íntrons na ORF 1.

ABSTRACT

ALMEIDA, Ana Paula Morais Martins, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009. **Characterization of the transposable element Boto in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witch's broom disease in cocoa tree (*Theobroma cacao*)**. Advisor: Marisa Vieira of Queiroz. Co-Advisors: Denise Mara Soares Bazzolli and Elza Fernandes de Araújo.

The hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witch's broom disease in cocoa (*Theobroma cacao*), presents different transposable elements in its genome. A transposable element of Class II belonging to the super-family PIF/Harbinger, named Boto, had been partially characterized in previous studies. The element Boto, as well as other elements PIF/Harbinger, presents two ORFs (ORF 1 and ORF 2). ORF 2 codifies the transposase while ORF 1 codifies one protein whose function is unknown. The aim of this work was to prove the Boto element activity and characterize the ORF 1. To assure the activity of the transposable element Boto in the genome of *M. perniciosa* was carried out the evaluation of the integration profile in isolates resultants of sexual cycle. Three of such isolates showed variation in the copy number of transposable element *Boto*, proving Boto activity. Furthermore, PCR reactions were carried out for detection of insertion sites of this element in different isolates. Among the 28 isolates used in this experiment, 14 showed amplification products with expected size. The products of amplification of two isolates, randomly chosen, were cloned and sequenced. The analysis of the obtained sequences showed that in both isolated sequenced the element Boto did not transpose for the insertion site analyzed in the *M. perniciosa* genome. It proves the activity of this element in the genome of *M. perniciosa*, because, in the isolate used as reference for this study, the Boto element was inserted in that position. In the *in silico* analysis of the ORF 1 sequence, the presence of two possible introns was verified, one containing 55 pb and another 48 pb. This sequence codifies a protein of 422 amino acids residues. To demonstrate the presence of the two introns, experiments of RT-PCR were carried out using two oligonucleotides groups. Amplified products obtained, when cDNA was used as template of PCR reaction, were cloned and

sequenced, being confirmed the position and the size of the two predicted introns. Analysis of RT-PCR also showed that this ORF is expressed even in normal conditions of cultivation of the fungi, what is important for activity of this element, since other studies showed that the expression of this ORF is fundamental to the transposition of elements PIF/Harbinger. The results of this work showed that Boto is active in the *M. perniciososa* genome and it can have an important role as generating agent of genetic variability in this phytopathogen. It is worth to emphasize that this is the first description of an element of the superfamily PIF/Harbinger that presents two introns in ORF 1.

1- INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis são seqüências de DNA moderadamente repetitivo, capazes de sofrer transposição e, portanto, podem acarretar grande variação estrutural no genoma do hospedeiro. Estes elementos são ubíquos, sendo que em uma mesma espécie de fungo podem ser encontrados elementos pertencentes a diferentes classes de transposons.

Moniliophthora perniciosa é o agente causal da vassoura-de-bruxa, principal doença que acomete a cultura do cacaueteiro (*Theobroma cacao*). Este fungo apresenta ampla variabilidade genética, o que é fator complicador para seu controle, pois, dificulta a obtenção de cultivares de cacaueteiro com resistência duradora.

No genoma de *M. perniciosa*, foi descrito um elemento transponível denominado *Boto*. Este elemento pertence à superfamília *Pif/Harbinger*, sendo caracterizado pela presença de sítio de inserção TAA e duas ORFs (Open Reading Frame), uma que codifica a transposase e uma segunda (ORF 1) cuja proteína possui função desconhecida. A ORF 1 possui uma região que apresenta baixa similaridade com motivo de ligação ao DNA do fator de transcrição *myb* de algumas plantas e animais, o que representa um indício de que ela pode estar relacionada ao controle da transposição. A ORF que codifica a transposase foi caracterizada anteriormente, mas a ORF 1 foi, superficialmente, analisada e seu produto pode desempenhar importante papel no processo de transposição.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: comprovar a ocorrência de transposição do elemento *Boto* por meio da detecção dos sítios de inserção e da análise da transposição durante o ciclo sexual; e estudar a organização estrutural e a expressão da ORF 1 presente em *Boto*.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- *Moniliophthora perniciosa*

Moniliophthora perniciosa (Aime & Mora, 2005) é um basidiomiceto de ciclo de vida hemibiotrófico e originário, provavelmente, da bacia amazônica em uma região que engloba o leste do Equador, sudeste peruano e centro-sul da Colômbia (Montamayor et al., 2002). Este fungo é o agente causal da vassoura-de-bruxa, principal doença do cacauzeiro (*Theobroma cacao*). Em 1989, houve o primeiro relato de infecção de cacauzeiro por *M. perniciosa*, em uma importante região produtora brasileira, o estado da Bahia. Desde então, a disseminação deste fitopatógeno fez com que o Brasil passasse de segundo no *ranking* dos maiores exportadores de cacau do mundo, com uma produção em 1989 de 392,18 mil toneladas de amêndoas deste fruto, a importador de cacau. Em 2005, a produção de amêndoas de cacau no Brasil atingiu apenas 209 mil toneladas (Ministério da Agricultura, 2006). Esta crise na produção do cacau, gerada pela devastação das plantações pela vassoura-de-bruxa, somada à baixa do preço do produto gerou graves problemas socioeconômicos, principalmente nas regiões produtoras (SUFRAMA, 2007).

M. perniciosa apresenta quatro biótipos determinados pela análise de características morfológicas, culturais, estudos de inoculação em plantas e grupos de incompatibilidade (Griffth & Hedger, 1994a). Representantes do biótipo C infectam plantas pertencentes à família *Sterculiaceae*, predominantemente os gêneros *Theobroma* e *Herrania*, sendo este o único biótipo cujos representantes causam perdas econômicas (Evans, 1978; Bastos et al., 1988). O biótipo S causa sintomas da doença em *Solanaceae* (Bastos & Evans, 1985; Griffth & Hedger, 1994b). Os isolados pertencentes ao biótipo L são saprófitas e utilizam uma variedade de substratos. O biótipo H foi o mais recentemente descrito (Resende et al., 2000) e infecta *Heteropterys acutifolia*, pertencente à família *Malpighiaceae*. Os representantes dos bióticos C e S são homotáticos, enquanto os representantes do biótipo L são heterotáticos (Griffth & Hedger, 1994b).

Quando infecta o cacauero, *M. pernicioso* apresenta duas fases fisiológicas distintas: a primeira é biotrófica e o micélio cresce nos espaços intercelulares do tecido do hospedeiro sem causar morte das células vegetais; e a segunda fase é necrotrófica, sendo que o micélio torna-se intracelular, utilizando os nutrientes obtidos da morte das células do tecido infectado. Em condições ambientais favoráveis e após 3 a 6 meses de infecção da planta, ocorre a formação dos basidiocarpos com posterior liberação dos basidiósporos. Como os biótipos C e S são homotáticos e, portanto, possuem micélio autofértil, o genótipo parental é disseminado sem necessidade de cruzamento com micélio compatível antes da formação do basidiocarpo, o que leva a uma disseminação rápida e clonal do fungo (Griffith & Hedger, 1994a).

Estudos genéticos baseados em marcadores de RAPD (Andebrhan & Furtek; 1994 Andebrhan et al., 1999), ERIC-PCR (Arruda et al., 2003) e cariotipagem molecular (Rincones et al.; 2003; Rincones et al., 2006; Gramacho et al., 2007; Silva et al., 2008) demonstraram alta variabilidade genética neste fungo.

Entre os processos que podem gerar esta variabilidade em *M. pernicioso*, os elementos transponíveis podem apresentar função fundamental, uma vez que, segundo Daboussi (1997), estes podem ser os principais responsáveis pela alta adaptabilidade e plasticidade apresentada por muitas espécies de fungos.

2.2 Elementos transponíveis

Elementos transponíveis podem ser definidos como seqüências de DNA moderadamente repetitivas, que se encontram dispersas no genoma. As cópias ativas desses elementos são capazes de mover-se de um local ao outro do genoma, sendo que sua inserção, embora não necessite de uma região de homologia, não é totalmente aleatória.

Elementos transponíveis são os maiores constituintes da fração repetitiva do genoma, sendo encontrados em todas as espécies dos três domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya (Daboussi, 1997). Entretanto, a proporção de elementos transponíveis em cada genoma é variável, sendo

apontada por Wright & Finnegan (2001) como uma das grandes diferenças, em nível de genoma, entre as espécies eucarióticas. Em milho (*Zea mays*) estes elementos correspondem a cerca de 60% do genoma (Messing & Dooner, 2006), enquanto em *Drosophila melanogaster* correspondem a 15% (Pimpinelli et al., 1995) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a 3,1% apenas (Goffeau et al., 1996). Embora amplamente distribuídos, os primeiros relatos da presença de elementos transponíveis em fungos filamentosos ocorreram há 50 anos, aproximadamente, após a descoberta desses elementos em 1947, pela pesquisadora Bárbara McClintock (McClintock, 1947).

Devido ao crescente aumento de informação sobre os elementos transponíveis e bem como à grande diversidade apresentada pelos mesmos, Wicker e colaboradores (2007) apresentaram um novo modelo unificado de classificação dos elementos transponíveis eucarióticos, baseado no modelo anteriormente proposto por Finnegan (1989).

Neste modelo unificado, os elementos transponíveis são divididos em duas classes de acordo com a presença ou ausência de um intermediário de RNA durante o processo de transposição. Os elementos que possuem este intermediário são denominados Classe I ou retrotransposons, enquanto aqueles que não possuem este intermediário são agrupados na Classe II (transposons de DNA). A classe II é, ainda, dividida em duas subclasses. A subclasse 1 é composta por elementos que não se duplicam antes da inserção e se transpõem por mecanismos de excisão e integração e, portanto, tem ambas as fitas do DNA clivadas durante o processo de excisão. Quanto à subclasse 2, é composta por aqueles elementos que se duplicam antes da inserção e, portanto, tem somente uma das fitas de DNA clivadas durante o processo de transposição (Wicker et al., 2007).

O taxon seguinte, Ordem, é dividido de acordo com as diferenças na organização geral do elemento transponível e também em sua enzimologia. De acordo com este modelo, as superfamílias pertencentes a uma mesma ordem deveriam compartilhar uma estratégia de replicação, mas seriam distinguidas com base em certas características como estrutura da proteína e regiões não codificantes, presença e tamanho da duplicação do sítio-alvo (TSD, do inglês Target Site Duplication) (Wicker et al., 2007).

As superfamílias, por sua vez, são divididas em famílias. Estas são definidas de acordo com a identidade na seqüência de DNA dos elementos transponíveis que a compõem. As famílias podem ser, ainda, divididas em subfamílias definidas com base em dados filogenéticos. Embora uma mesma família de elementos transponíveis pode conter tanto elementos autônomos quanto elementos não autônomos, estes elementos são classificados em diferentes subfamílias. Segundo Wicker e colaboradores (2007) um elemento autônomo é aquele que apresenta todas as regiões codificadoras necessárias para que ocorra a transposição, independentemente de ser ativo ou não. Enquanto elementos transponíveis não autônomos são aqueles que não possuem parte ou toda a região codificadora encontrada no elemento autônomo. Frequentemente elementos não autônomos são originados por meio de deleção interna de elementos autônomos (Zhang et al., 2001; Kikuchi, 2006). O menor taxon, inserção, diz respeito a uma cópia particular que corresponde a um evento específico de transposição e inserção (Wicker et al., 2007).

2.2.1- Elementos transponíveis da Classe II

Elementos transponíveis da Classe II são divididos em duas subclasses. A subclasse 1 compreende elementos transponíveis, que se transpõem por mecanismo de excisão e integração, sendo que, durante o processo de excisão, ambas as fitas do DNA são clivadas (Wicker et al., 2007).

A transposição desta subclasse de elementos é mediada pela enzima transposase, a qual se liga próximo ou nos dois *boxes* específicos das terminações repetidas invertidas (TIRs, do inglês Terminal Inverted Repeated), que são seqüências palindrônicas localizadas no meio do final 3' de cada TIR e que possuem papel importante na ligação da transposase, visto que as TIRs apresentam motivos de ligação à transposase e sítios de clivagem em suas extremidades. Além das TIRs, a região UTR (do inglês Untranslated Region), que é aquela compreendida entre a TIR e a ORF que codifica a transposase, também desempenha papel no processo de transposição, pois, as UTRs contêm informação necessária para a

transcrição e tradução da transposase. A transposase catalisa a reação de quebra, excisando o transposon e inserindo-o em um novo local no genoma. Durante o processo de inserção, forma-se um *gap* no DNA que, por meio de reações químicas sucessivas, é reparado com a formação dos TSDs. O comprimento do TSD formado é determinado por propriedades catalíticas de cada transposase, o que faz com que elementos transponíveis da mesma superfamília possuam, geralmente, TSDs do mesmo tamanho (Benjamin, et al., 2007; Bouvet, et al., 2008; Feschotte et al., 2002). Além disso, a excisão do elemento transponível do sítio doador é frequentemente imperfeita, levando à formação de *footprints*. Estes *footprints* são pequenas deleções, inversões ou mesmo introdução de alguns pares de base na região onde o elemento transponível se excisou (Nakajima et al., 2005; Feschotte & Pritham, 2007; Hikosaka & Koga, 2007).

Como elementos da classe II se transpõem por mecanismo não replicativo, o aumento no número de cópias destes elementos ocorre por meio de mecanismos indiretos e dependentes da maquinaria do genoma hospedeiro, tais como a transposição durante o processo replicativo e mecanismos de reparo de quebra de dupla fita via recombinação homóloga (Feschotte & Pritham, 2007).

A subclasse 1 apresenta duas Ordens. A primeira e mais bem conhecida é a ordem TIR, caracterizada por terminais invertidos repetidos e de tamanho variável. Esta ordem possui nove superfamílias que se distinguem por suas seqüências TIR e TSD. Estas superfamílias são: *Tc1-mariner*, *Mutator*, *hAT*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *PIF/Harbingerr*, *CACTA* e *Crypton* (Wicker et al., 2007).

A superfamília *Tc1-mariner* é uma das mais diversas e amplamente distribuída na natureza. A estrutura dos elementos transponíveis pertencentes a esta superfamília é simples, sendo constituída de uma ORF, que codifica a transposase flanqueada pelas TIRs. Nesta superfamília, estão presentes elementos com repetições terminais invertidas de tamanho variável, sendo que no elemento *Fot1* estas repetições terminais são de 12 a 17 pb e no elemento transponível Tc3 os TIRS possuem 462 pb. Os elementos transponíveis variam de 1,3 a 2,4 Kb, sendo que esta variação ocorre principalmente devido à variação no comprimento dos TIRs. Alguns

elementos como *Tc1*, *Tc3* e *Mimos* ainda apresentam íntrons na ORF, que codifica a transposase. Existe ainda, em vários elementos desta superfamília, a formação de um TSD de seqüência TA devido à preferência de integração adjacente a esta seqüência (Benjamim, et al., 2007; Daboussi & Capy, 2003; Wicker et al., 2007).

Elementos da superfamília *hAT* apresentam duplicação de 8 pb do sítio-alvo, TIRs relativamente pequenas, 5-27 pb e menos de 4 Kb de comprimento total do elemento transponível (Wicker et al., 2007). Dentre os elementos desta superfamília, se destaca o elemento *Restless* isolado inicialmente de linhagens de *Tolypocladium intatum* (Kempken & Kück, 1996). O número de cópias do elemento transponível *Restless* é variado entre as espécies estudadas, sendo que na linhagem, onde ele foi inicialmente isolado, o número de cópias é 15 (Kempken et. al, 1998). Este elemento tem sido utilizado em protocolos de inativação gênica, sendo que um gene regulatório do metabolismo de nitrogênio de *T. intatum*, *tnir1* foi identificado com o auxílio deste elemento (Kempken & Kück, 2000).

Elementos transponíveis pertencentes à superfamília *Mutator* são encontrados em plantas, fungos e também procaríotos (Eisen et al., 1994; Lisch et al., 2001; Chalvet et al., 2003). O primeiro elemento transponível identificado como pertencente a esta superfamília é o *Mutator*, encontrado no genoma de milho. Este elemento transponível é reconhecido como um dos elementos transponíveis mais ativos em plantas e foi amplamente usado em sistemas de mutagênese (Leeuwen et al., 2007). Elementos *Mutator*-like possuem repetições terminais invertidas de aproximadamente 200 pb e duplicam 9 pb do sítio-alvo durante a inserção. O elemento *Hop*, encontrado em *Fusarium oxysporum*, foi o primeiro elemento transponível identificado em fungo, pertencente a esta superfamília. Este elemento possui 3.299 pb e apresenta seqüências terminais invertidas repetidas de 99 pb, que flanqueiam uma ORF não interrompida de 2,507 pb. Além disso, foi encontrada uma duplicação de 9 pb do sítio-alvo (GGGACACCG) na maioria das cópias de *Hop* sequenciadas. Contrariamente ao relatado para os elementos transponíveis da superfamília *Mutator*, nas cópias do elemento *Hop* analisadas foi observada grande homogeneidade em relação à sua estrutura e tamanho (Chalvet et al., 2003).

Elementos pertencentes à superfamília *Merlin* foram encontrados em um amplo espectro de genomas animais e também em eubactérias, mas não foram encontrados em fungos. Os terminais repetidos invertidos destes elementos variam entre 24 e 462 pb e são flanqueados por repetições diretas de 8-9 pb. Elementos Merlin possuem uma ORF, que codifica uma transposase de cerca de 300 aminoácidos e que apresenta forte similaridade com transposases de um grupo de seqüências de inserção bacterianas (IS1016). Elementos autônomos desta superfamília podem ter mais de 10 Kb de comprimento, enquanto alguns elementos não autônomos podem chegar a possuir poucas centenas de pares de base (Feschotte, 2004; Wicker et al., 2007).

A superfamília *Transib* é constituída de elementos transponíveis que possuem 3 a 4 Kb, produzem TSDs de 5 pb ricas em GC e seus terminais repetidos invertidos possuem 9 a 60 pb. A transposase codificada por elementos pertencentes a esta superfamília possui cerca de 700 aminoácidos e não apresenta similaridade com transposase de nenhuma outra superfamília, mas possui similaridade significativa com a proteína RAG1, relacionada à recombinação V(D)J. Recombinação V(D)J é um tipo de reação de recombinação, que envolve segmentos gênicos não homólogos, V, D e J dos genes da imunoglobulina (Ig) e receptor para o antígenos (TCR) responsável pela formação da porção variável destas proteínas. Este mecanismo é responsável pela grande variedade de imunoglobulinas e receptores para antígenos, encontrada nos vertebrados (Kidwell & Lisch, 2000; Kapitonov & Jurka, 2005).

Além disso, evidências mostram que os TIRs dos elementos *Transib* podem ser a seqüência ancestral das seqüências sinais do sistema de recombinação V(D)J. Tais evidências suportam a teoria segundo a qual a recombinação V(D)J é produto de um evento de domesticação de elementos transponíveis (Kapitonov & Jurka, 2005; Feschotte & Pritham, 2007). O primeiro relato de um elemento íntegro desta superfamília foi realizado por Chen & Li (2007). Este elemento, denominado *Hztransib*, foi isolado de *Helicoverpa zea* e possui 3518 pb incluindo um terminal repetido invertido 5' de 552 pb e um terminal repetido invertido 3' de 502 pb. A transposase

codificada por este elemento possui 507 aminoácidos e suas duplicações do sítio-alvo possuem 5 pb (CGTCG).

Elementos da superfamília *piggyBac* são caracterizados por sua preferência de inserção em sítios TTAA e por possuírem dois a três resíduos C/G na extremidade de seus terminais repetidos invertidos. O tamanho médio de cada elemento desta superfamília é 2,5 Kb aproximadamente, sendo que este elemento possui uma ORF que codifica uma transposase funcional de cerca de 64 kDa, a qual contém uma região rica em cisteína em sua porção C-terminal. Seus TIRs possuem 13 pb, sendo que estes elementos ainda apresentam repetições internas de 19 pb distribuídas assimetricamente (Penton et al., 2002; Wang et al., 2008). Elementos *piggyBac* são amplamente distribuídos em eucariotos, sendo que seqüências similares a *piggyBac* foram encontradas, inclusive, nos fungos *Nectria haematococca*, *Phytophthora sojae* e *Phytophthora Infestans* (Sarkar et al., 2003).

O elemento transponível *piggyBac* tem grande potencial para ser usado como ferramenta em estudos moleculares e terapia gênica, pois, possui a capacidade de inserir genes exógenos maiores que 14 kb em células embrionárias de camundongos, é capaz de se transpor em uma grande variedade de organismos, incluindo humanos, bem como sua excisão é perfeita, não deixando *footprint*. (Ding, et al., 2005; Feschotte 2006, Wu, et al., 2006). Além disso, quando comparado com outros transposons que também são utilizados em estudos moleculares, *piggyBac* apresentou frequência de transposição maior em todos os quatro tipos de células de mamíferos usados no estudo (Wu, et al., 2006).

Elementos pertencentes à superfamília *CACTA* são encontrados principalmente em plantas, sendo que sua presença foi relatada recentemente em animais e fungos (DeMarco et al., 2006). O nome desta superfamília vem da seqüência-consenso encontrada nas extremidades das TIRs destes elementos, embora em fungos e animais esta seqüência seja CCC. Além disto, em animais e fungos, os TSDs possuem dois pares de base, enquanto em plantas os TSDs são de três pares de base. Elementos *CACTA* apresentam, além do gene que codifica a transposase, uma segunda ORF (DeMarco et al., 2006; Wicker et al., 2007). No elemento *Spm*, devido à

ocorrência de *splicing* alternativo, há produção de quatro diferentes transcritos, *tnpA*, *tnpB*, *tnpC* e *tnpD*, sendo os transcritos *tnpA* e *tnpB* monocitrônicos e os transcritos *tnpC* e *tnpD*, dicitrônicos. Além disso, dentre quatro transcritos, *tnpA* e *tnpD* codificam proteínas cujo papel é essencial ao processo de transposição deste elemento (Masson et al., 1991).

A superfamília *P* é composta por elementos que geram TSDs de oito pares de base (Wicker et al., 2007). Dentre os elementos pertencentes a esta superfamília, o mais estudado é o elemento *P* encontrado em *Drosophila melanogaster*, o qual dá nome à superfamília. O elemento *P* possui quatro éxons no gene que codifica para a transposase, TRIs de 31 pb e repetições invertidas subterminais de 11 pb. Este elemento é, amplamente, utilizado como ferramenta em estudos moleculares em *D. melanogaster*. Entretanto, para que o elemento transponível *P* pudesse ter esta função, o gene que codifica a transposase foi modificado, já que este elemento era ativo somente em células embrionárias. Em células somáticas, não havia a retirada do íntron entre os éxons dois e três, devido à ação de uma proteína repressora de *splicing* e, assim, havia formação de uma transposase truncada, que agia como repressora da transposição deste elemento (Ryder & Russell, 2003).

Elementos autônomos pertencentes à superfamília *PIF/Harbinger* possuem TIRs variando de 14-25 pares de bases e são flanqueados por TSD de três pares de base, cuja seqüência é TTA ou TAA (Jurka & Kapitonov, 2001; Grzebelus et al., 2007). Além disso, possuem duas seqüências de leitura aberta sendo que uma codifica a transposase e a outra, uma proteína de função desconhecida. A transposase codificada por estes elementos ainda apresenta similaridade com seqüências de inserção bacteriana do tipo *IS5* (Zhang et al., 2004). A ORF 1 destes elementos, a qual codifica a proteína de função desconhecida, é mais divergente entre os membros da superfamília *PIF/Harbinger* do que a ORF responsável pela codificação da transposase. Entretanto, ela apresenta blocos de aminoácidos conservados, sendo que, nos elementos semelhantes à *PIF/Pong*, o bloco mais conservado é localizado em uma região de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, que apresenta baixa similaridade com motivo de ligação ao DNA do fator de transcrição *myb* de algumas plantas e animais (Zhang et al., 2004). Este é um indício de que esta ORF pode estar relacionada ao controle

da transposição. Além disso, Yang e colaboradores (2007) demonstraram que, para a transposição do elemento não autônomo *mPing* em *A. Thaliana*, era necessário a presença tanto da transposase quanto da segunda ORF funcionais.

A organização destas ORFs (cabeça-cabeça, cabeça-cauda, cauda-cauda) é variável dentre os elementos presentes em diferentes organismos. Dentre os elementos pertencentes a esta família o elemento *PIF* e o elemento *Harbinger* foram, primeiramente, identificados.

O elemento transponível *Harbinger* foi, inicialmente, identificado no genoma de *Arabidopsis thaliana* por meio de análise de seqüência. Este elemento possui 5.382 pb e codifica duas proteínas denominadas HARBX e HARB. Embora HARBX não tenha apresentado similaridade com alguma outra proteína, HARB apresentou similaridade com várias transposases de seqüências de inserção bacterianas (Kapitonov & Jurka, 1999).

O elemento *PIF* (*P Instability Factor*), encontrado no genoma do milho, foi identificado como múltiplas inserções de 2,3 e 5,2 kb no íntron dois do gene R, regulador responsável pelo controle da síntese e distribuição do pigmento antocianina em diversos tecidos da planta (Walker et al., 1997). Estes elementos denominados PIF 12 e PIF 6, respectivamente, sofrem transposição, embora análise de sua seqüência tenha mostrado que ambos não são autônomos (Jurka e Kapitonov, 2001). Os elementos *PIF* também foram associados à origem e mobilidade dos elementos não-autônomos MITES (miniature inverted-repeated transposable elements) do tipo *Tourist-like* (Zhang et al., 2001), os quais passaram a integrar a superfamília *PIF/Harbinger* após esta descoberta (Jurka & Kapitonov, 2001).

Os elementos *PIF/Harbinger* são abundantes em plantas, sendo encontrados em várias espécies de angiospermas (tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas), gimnospermas e também no genoma de algumas algas. Entretanto, sua presença só foi relatada em três espécies de fungos, *Filobasisiella neoformans*, *Neurospora crassa* (Zhang et al., 2004) e *M. perniciosus* (Pereira, 2005). Esta distribuição esporádica e desuniforme destes elementos em fungos é um indício de que estes foram transferidos horizontalmente (Zhang et al., 2004; Grzebelus et al., 2007; Grzebelus & Simons, 2008).

A segunda ordem da subclasse 1 é composta pela superfamília *Crypton*. Esta superfamília ainda é pouco conhecida, sendo que todos os seus elementos descritos até o momento foram encontrados em fungos. Os elementos desta superfamília contêm uma única ORF, muitas vezes interrompida por íntrons, como no caso do elemento *Crypton Cn 1*, onde os íntrons estão presentes em número de cinco. Esta ORF codifica uma tirosina recombinase, cujo domínio C terminal parece estar envolvido com ligação ao DNA (Goodwin, et al., 2003). Seqüências que codificam tirosinas recombinases semelhantes a dos elementos *Cryptons* são também encontradas em alguns fagos, seqüências de inserção bacterianas e mesmo retrotransposons *DIRS-like*. Entretanto, elementos *Cryptons* não possuem alguma OFR que codifique transcriptase reversa, o que sugere que eles se transponham via intermediário de DNA (Goodwin, et al., 2003; Wicker et al., 2007). Elementos transponíveis desta superfamília não possuem TIRs, mas levam a duplicação do sítio-alvo, o que pode ocorrer em decorrência de seu mecanismo de transposição, que envolve recombinação e integração. Acredita-se que o elemento se excisa por recombinação em uma reação envolvendo, provavelmente, a tirosina recombinase. O DNA dupla fita excisado é circularizado, sendo que a junção circular contém uma única cópia da repetição direta, que flanqueia o elemento (seqüência doadora). Este DNA se move para um novo local no genoma, que possui uma seqüência idêntica ou muito similar à seqüência doadora, inserindo-se via recombinação, gerando a repetição direta que flanqueia o elemento (Goodwin et al., 2003).

A subclasse 2 é formada por elementos transponíveis, que se transpõem sem a ocorrência de clivagem de dupla fita. Neste caso, a transposição envolve o deslocamento de uma única fita, mas não há presença de intermediário de RNA no processo, o que é característico de elementos pertencentes à classe II. Dentro dessa subclasse, existem duas ordens, *Helitron* e *Maverick* (Wicker et al., 2007).

Elementos dessa ordem são caracterizados por se replicarem por meio de um mecanismo semelhante ao círculo rolante, tendo somente uma das fitas do DNA clivadas. Além disso, elementos pertencentes à ordem *Helitron* possuem motivos 5'-TC e CTRR-3' em seus terminais (sendo R uma

purina), não apresentam TIRs, formam *hairpins* de 16 a 20 pares de bases separados por 10-12 nucleotídeos do terminal 3', se transpõem precisamente entre o 5' A e o 3' T do sítio-alvo no hospedeiro, não ocasionando duplicação do sítio-alvo (TSD) ou qualquer outra modificação no mesmo (Kapitanov & Jurka, 2001; Kapitanov & Jurka, 2007). Elementos autônomos ainda codificam uma tirosina recombinase do tipo Y2, semelhante às encontradas em transposons bacterianos, que se duplicam por meio de círculo rolante (Wicker et al., 2007). Esta proteína apresenta domínio helicase, envolvido no desnovelamento do DNA duplex formado durante o processo, um domínio relacionado à iniciação da replicação, que catalisa a reação de clivagem e ligação do DNA, e ainda um motivo "duas tirosinas" responsável pela transferência de uma das fitas do DNA do *Helitron* para o sítio-alvo (Pritham & Feschotte, 2007). Em algumas espécies, estes elementos podem ainda codificar uma ou várias outras proteínas como, por exemplo, uma proteína similar à proteína de replicação A, que se liga ao ssDNA (Kapitanov & Jurka, 2001).

A segunda ordem denominada *Maverick* também é conhecida como *Politons* e está presente de maneira desuniforme em todos os reinos eucarióticos, a exceção das plantas (Pritham et al., 2007). Estes elementos possuem entre 15-20 kb, sendo que suas TIRs variam de 400 a 700 pares de bases e possuem TSDs de 6 pares de bases (Pritham et al., 2007; Kapitonov & Jurka, 2006). Apesar de seu extenso tamanho, elementos pertencentes a esta classe estão presentes em cerca de 3000 cópias no genoma de *Trichomonas vaginalis* (Pritham et al., 2007). *Mavericks* autônomos codificam uma série de proteínas. Em *Danio rerio*, além de quatro proteínas de função desconhecidas ainda são codificadas, por estes elementos, uma integrase, uma DNA polimerase B, uma protease adenoviral e uma ATPase. A ausência de uma região codificante para a transcriptase reversa sugere que este elemento se transponha sem intermediário de RNA. Kapitonov & Jurka (2006) propuseram que a transposição deste elemento ocorreria por meio da excisão de fita simples do elemento mediada pela proteína integrase, levando à formação de transposon fita simples extracromossomal, que é replicado pela DNA Polimerase B e integrado no genoma hospedeiro pela proteína integrase.

2.3- Elemento transponível *Boto*

A análise de seqüências que codificam proteínas transposase-*like* encontradas no banco de dados do Projeto Genoma da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro revelou a presença de um elemento transponível da *classe II*, denominado *Boto*, que apresenta características da superfamília *PIF/Harbinger*. A seqüência que codifica a transposase deste elemento foi utilizada como sonda, para a clonagem do elemento *Boto* completo de um banco genômico do fungo *M. pernicioso*, construído no fago lambda EMBL3 (Pereira, 2005).

Este elemento possui 3.089 pb e apresenta seqüências terminais repetidas invertidas de 45 pb. Uma seqüência de 3 pb (TAA) foi encontrada, flanqueando as repetições terminais e caracterizando, assim, a ocorrência de duplicação do sítio-alvo. O elemento *Boto* possui duas ORFs, uma ORF inicia-se 127 pb “downstream” da região terminal repetida 5’ e codifica uma proteína contendo 414 aminoácidos, que possui alta similaridade com as transposases de elementos tipo *PIF* encontradas em plantas. Segundo Silva (2006), o gene que codifica a transposase putativa possui dois íntrons, um de 53 pb e outro de 48 pb (Figura 1). A região que codifica a transposase dos demais elementos *PIF* também possui íntrons; entretanto, a posição dos íntrons presentes no elemento *Boto* difere daquelas encontradas em elementos *PIF-like*.

A segunda ORF do elemento *Boto*, denominada ORF 1, codifica uma proteína de função desconhecida, que apresenta baixa similaridade com fatores de transcrição, o que pode ser um indício de que esta proteína seja uma proteína de ligação ao DNA (Pereira, 2005). Entretanto, esta ORF em *M. pernicioso* apresenta um tamanho reduzido, em comparação com aquelas observadas nos demais elementos *PIF/Harbinger*, como no caso do elemento *DcMaster* encontrado em *Daucus carota*, onde a segunda ORF possui 1375 pb contendo dois éxons separados por um íntron e que codifica para uma proteína de 353 resíduos de aminoácidos (Grzebelus et al., 2006). Embora a função desta segunda ORF não seja clara, seu papel no processo

de transposição é crucial, sendo que a ausência de uma segunda ORF funcional leva a não transposição do elemento (Yang et al., 2007).

Os genes encontrados no elemento *Boto* se orientam em direções opostas, sendo que o gene que codifica para a transposase se encontra *upstream* em relação ao segundo gene (Pereira, 2005). Esta característica do elemento *Boto* é também contrastante com o que foi até agora relatado para elementos *PIF-like*, cujos genes são orientados de maneira oposta, mas apresentam a seqüência que codifica a transposase *downstream* ao outro gene (Zhang et al., 2004).

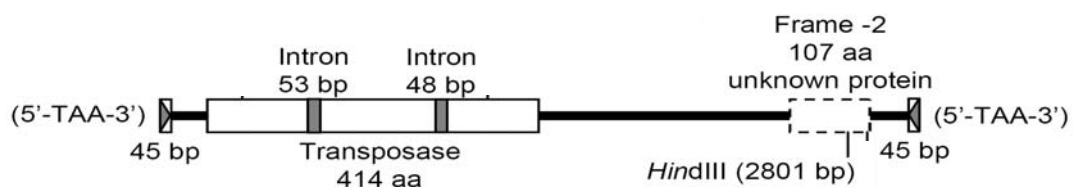


Figura 1: Esquema do elemento transponível *Boto* (Silva, 2006).

A análise do perfil de distribuição do elemento *Boto* em isolados de diferentes biótipos de *M. perniciososa* revelou, somente, uma cópia deste elemento em isolados do biótipo S, nenhum elemento *Boto* foi detectado no isolado do biótipo L analisado e 6-12 cópias deste elemento foram encontradas em isolados do biótipo C. A análise de parâmetros como a variação no número de cópias e distribuição de elementos *Boto* juntamente com o fato de a transposase de *Boto* ser expressa mesmo em condições normais de cultivo, sendo que estresse por carência de carbono ou nitrogênio não influenciou sua expressão, demonstram a atividade deste elemento em *M. perniciososa* (Pereira, 2005).

2.4- Elementos transponíveis e o genoma hospedeiro

Elementos transponíveis possuem importante função na evolução dos genomas. Este fato é devido, principalmente, ao amplo espectro mutacional destes elementos (Kidwell & Lisch, 1997). As mutações geradas por elementos transponíveis podem ser causadas pelo próprio mecanismo de transposição. Neste caso, elementos da classe II geram variabilidade adicional devido a seu mecanismo de excisão e integração, em que pequenas seqüências de DNA são deixadas no sítio de excisão (Colot et al., 1998). Atualmente, elementos transponíveis da classe II são considerados como a principal fonte de mudanças evolucionárias, visto que podem se inserir em uma variedade de sítios do genoma devido sua curta seqüência-alvo.

Todavia, elementos transponíveis da classe I, juntamente com processos de poliploidização, estão relacionados ao aumento do conteúdo genômico, devido seu mecanismo de transposição replicativa (Wright et al., 1996; Piegu et al., 2006). Uma série de rearranjos genéticos como inversões (Mathiopoulos et al., 1998), duplicações (Thon et al., 2006) e translocações (Codon et al., 1997) são, atualmente, relacionados a elementos transponíveis cuja atuação causa, portanto, grande impacto no genoma do hospedeiro. Duas teorias principais tentam explicar como este elemento é mantido no genoma hospedeiro, apesar de gerar tais mudanças.

A primeira é a hipótese do DNA parasita, também conhecida como hipótese do DNA egoísta. Esta hipótese considera que a transposição causa, na maioria das vezes, efeitos negativos para o hospedeiro e que os elementos transponíveis só são mantidos no genoma devido sua grande capacidade de autoduplicação. Neste caso, a abundância de elementos transponíveis na população seria controlada por um balanço entre as forças de transposição que aumentariam a abundância do elemento e a ação da seleção purificadora, que removeria indivíduos com alto número de cópias. Além disso, os elementos transponíveis seriam mais ativos e frequentemente encontrados em organismos, que realizam reprodução sexuada, enquanto organismos que realizam reprodução assexuada teriam uma baixa

frequência de transposição e até mesmo poucos elementos transponíveis (Wright & Finnegan, 2001; Kidwell & Lisch, 1997).

De acordo com a segunda teoria, atualmente mais aceita, os elementos transponíveis não são meros parasitas genômicos e podem prover uma série de benefícios ao hospedeiro ao causar a reestruturação do genoma (Kidwell & Lisch, 2000). Miller e colaboradores (1999) mostraram que, quando inseridos no genoma hospedeiro, elementos transponíveis podem passar a atuar como novos cis-elementos ou *enhancers* e, assim, modular a expressão de genes do hospedeiro. Além disso, em *Magnaporthe grisea*, a inserção do elemento transponível *Pot3* a 304 pb *upstream* do códon de iniciação do gene AVR-Pitta, em um isolado avirulento, fez com que o mesmo se tornasse virulento (Kang et al., 2001). A inserção de elementos transponíveis também pode agir interrompendo o gene e novas funções celulares podem ser adquiridas devido à presença desses elementos, como é o caso da manutenção dos telômeros em *Drosophila*, que é realizada pelos retrotransposons *Het-A* e *TART* (Pardue & DeBaryshe, 1999).

O impacto que a transposição tem na função do genoma vai depender da posição dos elementos transponíveis e de seus sítios de inserção. De acordo com o nicho genômico que ocupam os elementos transponíveis podem ser divididos em dois tipos. O primeiro tipo seriam aqueles que se inserem dentro ou próximo de seqüências de cópia única, enquanto o segundo tipo seria constituído de elementos transponíveis, que se inserem preferencialmente dentro de regiões distantes dos genes do hospedeiro, tais como regiões de heterocromatina ou regiões intergênicas como o caso dos retrotransposons *Ty* de *S. cerevisiae* onde os elementos *Ty1* e *Ty3* que se integram em regiões *upstream* dos genes de transcrição da RNA polimerase III tendo, portanto, pouco impacto na expressão gênica pelo fato de se tratar de regiões sem promotores e sem genes funcionais. Já o elemento *Ty5* se integra, preferencialmente, dentro de regiões de heterocromatina nos telômeros e loci mating-type silenciados (Ebina & Levin, 2007, Kidwell & Lisch, 1997 e Maxwell & Curcio, 2007).

O nicho ocupado também teria reflexo no efeito do elemento transponível sobre o organismo hospedeiro. Os elementos do primeiro tipo

estariam envolvidos em processos de alteração da expressão gênica do hospedeiro. Este tipo de elemento estaria sujeito a mecanismos de regulação, como metilação, heterocromatização e perda por recombinação. Em contrapartida, a região por eles ocupada é rica em fatores que favorecem a transcrição e a replicação. Os elementos do segundo tipo iriam afetar a arquitetura global do cromossomo hospedeiro. Entretanto, o fato de se inserirem em regiões, onde a presença de genes essenciais é rara e a taxa de recombinação é baixa, minimizaria o efeito desses elementos sobre o hospedeiro (Kidwell & Lisch, 1997).

2.5 Estresse e elementos transponíveis

Devido às alterações que os elementos transponíveis são capazes de causar no genoma hospedeiro, sua transposição é controlada por mecanismos epigenéticos como metilação (Ros & Kunze, 2001) ou de maneira dependente de homologia (Cogoni, 2001; Crouch et al., 2008). Entretanto, em vários organismos, a atividade dos elementos transponíveis pode ser induzida por fatores populacionais e ambientais, em particular por estresse.

Em geral, elementos transponíveis possuem uma baixa frequência de transposição (Labrador et al., 1999). Esta taxa de transposição em *D. melanogaster* é, em média, da ordem de 10^{-4} transposições por geração, como exemplificado pelas taxas de transposição dos elementos *copia* ($1,3 \times 10^{-3}$), *Doc* ($4,2 \times 10^{-3}$), *roo* ($3,1 \times 10^{-4}$) e *I* (8×10^{-4}) (Nuzhdin et al., 1996).

Entretanto, é amplamente relatado que a atividade dos elementos transponíveis pode ser induzida sob várias condições como, por exemplo, o ciclo sexual cuja influência sobre a transposição é relatada em diferentes organismos (Bouvet et al., 2008).

Em *Drosophila*, o aumento da frequência de transposição é observado, quando se cruzam indivíduos de diferentes origens geográficas, fenômeno conhecido como disgênese híbrida, e relatado para alguns elementos transponíveis como, por exemplo, *Oswaldo* (Labrador et al., 1999). Fenômeno semelhante foi relatado por Eto e colaboradores (2001) que cruzando dois isolados de *Pyricularia grisea*, que possuíam distribuição

assimétrica dos elementos transponíveis estudados (MAGGY, MGR586, MGR583, MG-SINE e Pot2), observaram que MAGGY transpôs ativamente durante e após o ciclo sexual, enquanto os demais não o fizeram. Uma explicação para isto pode ser o fato de os demais elementos estarem presentes em ambos os isolados, embora em número e distribuição distintos. Portanto, ambos os parentais poderiam estar equipados com um sistema de repressão da atividade destes elementos, o que não aconteceria com MAGGY, visto que ele só estava presente em um dos isolados utilizados no cruzamento.

Entretanto, outros fatores estressantes podem também aumentar a frequência de transposição de um dado elemento transponível. Para o retrotransposon *MAGGY*, presente em *M. grisea*, esses fatores foram: choque térmico, sulfato de cobre e estresse oxidativo. Todavia, a radiação ultravioleta, tratamento com enzimas líticas para a protoplastização e substâncias antifúngicas como sakuranetina e isoprotilanato não induziram a transposição deste elemento. Isto pode ser devido à ausência de elementos responsivos a estes agentes, nos promotores de *MAGGY* (Ikeda et al., 2001).

Bouvet e colaboradores (2008), analisando as seqüências UTRs e TIRs dos elementos transponíveis OPHIO1 e OPHIO2 presentes nos fungos *Ophiostoma ulmi* e *O. novo-ulmi*, detectaram a presença de seqüências semelhantes ao promotor *hsp* (relacionado com o desencadeamento da expressão dos genes da via de resposta ao choque térmico) no terminal 3' da 5'-TIR. A influência desta seqüência promotora *hsp*-like sobre a transposição destes elementos foi demonstrada, quando se analisou o perfil de integração destes elementos no genoma de fungos submetidos a choque térmico (55 °C durante uma hora). Nestes organismos ocorreu a perda de uma cópia do elemento transponível, o que pode ser devido a um processo de transposição incompleta, em que o elemento transponível foi capaz de se excisar mas não conseguiu integrar novamente no genoma hospedeiro.

Pereira (2005) utilizou a técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) e verificou que condições de estresse nutricional, seja ele por carência de fonte de carbono ou nitrogênio, não induziram aumento da expressão de transcritos *Boto-like* em *M. perniciosus*.

No entanto, utilizando as mesmas condições testadas para elementos *Boto-like*, observou aumento da expressão de transcritos do retrotransposon *CpSaci* em *M. perniciososa*.

A transposição como resposta a estresse ambiental pode ser vista como resposta adaptativa do genoma, visto que facilitaria sua reorganização e possibilitaria o surgimento de novos fenótipos, que suportariam melhor a condição de estresse (Ikeda et al., 2001; Daboussi & Capy, 2003).

Segundo Capy et al. (2000), existem duas hipóteses possíveis para a indução da atividade de elementos transponíveis sob condições de estresse. A primeira seria uma resposta direta ao estresse devido à presença de sítios para ativadores transcrpcionais nas regiões reguladoras dos elementos transponíveis. Estes sítios reguladores seriam semelhantes àqueles encontrados nos promotores de genes de defesa do organismo e seriam ativados após o estresse, devido uma cascata proteolítica que culminaria na liberação dos ativadores transcrpcionais. Um segundo modo de resposta seria aquele em que a condição de estresse levaria à desestabilização do genoma, o que acarretaria no mau funcionamento de vários sistemas genéticos. Neste caso, a indução da transposição não é efeito direto do estresse.

2.6 Aplicações dos elementos transponíveis

Atualmente, elementos transponíveis constituem uma importante ferramenta em estudos genéticos e moleculares. São utilizados em processos de inativação gênica por mutagênese insercional (Pereira et al., 2006), possuem potencial para serem usados em terapia gênica em humanos e mamíferos, onde os transposons têm sido modificados com o intuito de substituir os vetores virais (Feschotte, 2006; Shinohara et al., 2007) e em estudos de engenharia metabólica onde estes são utilizados para inserir seqüências de DNA de mais de 57 kb (Fu et al., 2008). Elementos transponíveis ainda têm sido utilizados em estudos de dinâmica populacional, evolução e para distinção entre populações geneticamente divergentes (Wright et al., 2001; Pereira et al., 2006; Hollister & Gaut, 2007).

Em estudos de mutação insercional, transposons apresentam a vantagem de etiquetar o gene mutado, facilitando sua clonagem (Pereira et

al., 2006). Além disso, alguns transposons, na presença da transposase, podem ser excisados do gene que estão interrompendo e, com isso, resultar na reversão do fenótipo ou dar origem a alelos com fenótipos 'fracos' (Ramachandran & Sundaresan, 2001). Elementos transponíveis como *Ac/Ds*, originalmente encontrado em milho, ainda têm uma característica interessante que é sua capacidade de transpor em espécies distintas, inclusive pertencentes a reinos distintos, como o caso de *S. cerevisiae* (Weil & Kunze, 2000) e *Danio rerio* (Emelyanov et al., 2006).

Alguns elementos transponíveis têm sido modificados para se tornar ferramentas mais convenientes aos estudos moleculares, como no caso do elemento *Ac*, que foi modificado para que fosse transposto somente quando induzido e uma única vez. O fato deste elemento não ser capaz de se transpor novamente evita transposição indesejada favorecida por estímulos endógenos do hospedeiro (Li, et al., 2008).

Em fungos, alguns elementos transponíveis como o *Restless* em *Trichoderma inflatum*, *Fot1* e *Impala* em *F. oxysporum* e *MAGGY* em *M. grisea* têm sido utilizados como ferramentas para estudos de mutação insercional em seus hospedeiros naturais e também testados quanto à sua transposição heteróloga (Nakayashiki et al.; 1999, Kempken & Kück, 2000; Migheli, et al., 2000; Nicosia et al., 2001; Vilalba et al., 2001). A atividade do elemento *Impala*, por exemplo, tem sido relatada em várias espécies de fungo, como *Aspergillus nidulans* (Nicosia et al., 2001), *A. fumigatus* (Firon et al., 2003), *Fusarium moniliforme* (Hua-van et al., 2001), *M. grisea* (Villalba et al., 2001) e *Penicillium griseoroseum* (DeQueiroz & Daboussi, 2003).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1- Microrganismos e condições de cultivo

Os isolados de *M. pernicioso* usados neste trabalho foram apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Identificação dos isolados utilizados neste trabalho

Isolado	Identificação na coleção	Biótipo	Origem	Hospedeiro	Instituição
1	ALF 42	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
2	ALF 110	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
3	ALF 179				
4	ALF 276	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
5	ALF 278	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
6	ALF 301	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
7	ALF 305	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
8	FA 281	C	Aiquara, BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
9	FA 317	C	Ilhéus, BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
10	FA 563	C	Ilhéus, BA	<i>Theobroma cacao</i>	FAC
11	DOA 100	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	-
12	CPO2	C	Itabuna, BA	<i>Theobroma cacao</i>	UESC
13	UNICAMP	C	Itabuna, BA	<i>Theobroma cacao</i>	UESC
14	Santo Amaro	C	Santo Amaro, BA	<i>Theobroma sp</i>	UNB
15	SABA	C	Santo Amaro, BA	<i>Theobroma cacao</i>	UFLA
16	Belmont	C	Belmont, BA	-	UFB
17	Ilhéus	C	Ilhéus, BA	-	UFB
18	606 G D-W	C	Itabuna/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
19	676 G D-W	C	Floresta Azul/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
20	896 FD-W	C	Jaguaquara/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
21	948 F D-W	C	-	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
22	1734 D-W	C	Gandu/BA	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
23	FA 607	S	Coimbra, MG	<i>Solanum lycocarpum</i>	FAC
24	FA 609	S	Poços de Caldas, MG	<i>Solanum sp</i>	FAC
25	RWB 500	S	Rio Pomba, MG	<i>Solanum cernuum</i>	UFV
26	RWB 551	S	Juiz de Fora	<i>Solanum lycocarpum</i>	UFV
27	SCL4	L	San Carlos, Equador	<i>Arrabidaea verrucosa</i>	UW
28	LA 17	L	Pichilinge, Equador	<i>Arrabidaea verrucosa</i>	UW

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

Além dos isolados citados na Tabela 1, foram obtidos isolados por meio da recuperação de basidiósporos do progenitor 1919 via ciclo sexual identificados na Tabela 2.

Tabela 2: Isolados obtidos via ciclo sexual de *M. pernicioso* P é o progenitor e os demais a prole obtida

Denominação do isolado	Identificação na coleção	Biótipo	Hospedeiro	Instituição
P*	1919	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P1**	1919 1.2	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P2**	1919 1.4	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P3**	1919 1.5	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P4**	1919 1.7	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P5**	1919 1.8	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC
P6**	1919 1.9	C	<i>Theobroma cacao</i>	CEPLAC

* P é o progenitor, ** os demais isolados são a prole obtida a partir da recuperação dos basidiósporos do isolado 1919.

Os isolados fúngicos foram mantidos em placas de Petri contendo meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) incubados a 28 °C, sendo repicados a cada 21 dias.

3.2- Extração de DNA

Para realizar a extração de DNA total, os isolados foram inoculados sobre papel celofane em placas contendo meio BDA sólido e incubados a 27 °C por 15 dias. O micélio obtido foi macerado em nitrogênio líquido. A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi a descrita por Speacht

et al. (1982) com modificações. O DNA total foi quantificado e sua qualidade analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.3- Oligonucleotídeos Utilizados

Os oligonucleotídeos usados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeos	Identificação	Seqüência
<i>Boto2ORFF1</i>	1F	5'-CTCATTGGTTGCCGAAGACT-3'
<i>Boto2ORFR1</i>	1R	5'-CCTCGGGTTGGCCTTAACAT A-3'
<i>Boto2ORFF2</i>	2F	5'-CAGAGCCAAACAGTGCAAAA-3'
<i>Boto2ORFR2</i>	2R	5'-CAGGTGGATTGAGTGTCTCGG-3'
<i>BOTO 2.1</i>	<i>BOTO 2.1</i>	5'- TGTAGGCATTCCGACTTTCGG -3'
<i>BOTO 2.2</i>	<i>BOTO 2.2</i>	5'- TTCGGATGCTCTTGCCGT -3'
CPORT1	CPORT1	5'- GCCTGAGCATGTCTGAAGATT -3'
CPORT2	CPORT2	5'- TTGCTTGTGAGCTTGGTGTC -3'

Os locais de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados são mostrados na Figura 2. Os oligonucleotídeos *Boto 2.1* e *Boto 2.2* foram utilizados nos experimentos de detecção dos sítios de inserção do elemento transponível *Boto*. O amplificado obtido quando se utilizou CPORT 1 e CPORT2 foi usado como sonda nos experimentos envolvendo hibridização. Os pares de oligonucleotídeos *Boto2ORFF1* - *Boto2ORFR1* e *Boto2ORFF2* - *Boto2ORFR2* foram utilizados para detecção de introns e também em experimentos de expressão da segunda ORF do elemento transponível *Boto*.

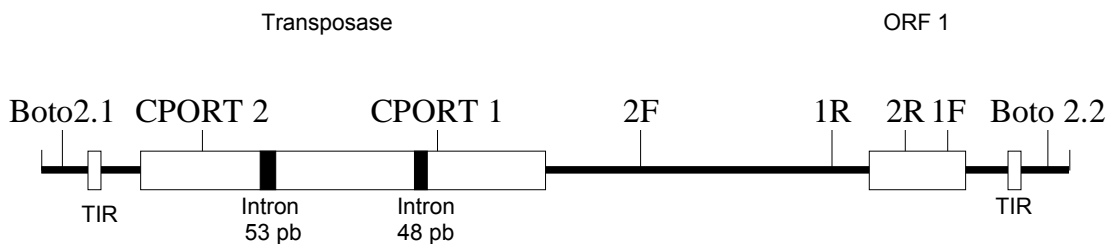


Figura 2: Esquema do elemento transponível *Boto* mostrando os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no presente estudo.

3.4- Análise por PCR (Polimerase Chain Reaction) para detecção de sítios de excisão (*footprints*)

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-100-MJ Research programado para realizar 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C, 1 minuto a 72 °C, e com um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. As reações foram preparadas para um volume final de 50 µL, contendo 1x thermophilic DNA poly buffer (Promega), MgCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ (Promega), 100 µmol L⁻¹ de cada dNTP, 0,2 µmol L⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 40 ng de DNA e uma unidade de Taq DNA polimerase (Promega).

Após o término das reações, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %.

3.5- Clonagem e seqüenciamento

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e seqüenciados pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1997) utilizando o seqüenciador MegaBace 500 (Amersham Pharmacia Biotech).

3.6- Análise do Perfil de Integração de *Boto*

O DNA total dos isolados oriundos do ciclo sexual foi clivado com a enzima de restrição *Sall*, escolhida por não apresentar sítio de reconhecimento no interior da seqüência de DNA utilizada como sonda, e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Os fragmentos de DNA foram, então, transferidos do gel de agarose para uma membrana de náilon de acordo com os protocolos padrões (Sambrook et al., 1989). Foram utilizados os kits de marcação e de detecção da GE Healthcare: Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System em condições de alta estringência e como sonda foi utilizado um fragmento de DNA de 795 pb do gene que codifica a transposase do elemento *Boto* obtido por meio de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos CPORT1 e CPORT2.

3.7- Extração de RNA Total e Análise por Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

O isolado de *M. perniciosus* CPO2 foi mantido em placas contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e incubado a 28 °C. Após sete dias de incubação, discos de micélio de 7mm de diâmetro foram transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio mínimo (MM) e incubados sob agitação de 100 rpm e a 28 °C. Após dez dias de crescimento o micélio foi filtrado, lavado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado para posterior extração de RNA Total.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase RQ1 RNase-free (Promega®). O RNA total extraído foi quantificado a 260 nm por espectrofotometria, utilizando-se o espectrofotômetro Pharmacia Biotech. Ultraspec® 3000. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,0 %.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega®). Para realização do PCR foram usados 2 conjuntos de oligonucleotídeos (*Boto2ORFF1* e *Boto2ORFR1* e *Boto2ORFF2*

e *Boto2ORFR2*) a fim de se comprovar a expressão da segunda ORF, seu tamanho e a presença ou não de introns. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100-MJ Research programado para realizar 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 51 °C, 1 minuto a 72 °C, e com um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. As reações foram preparadas para um volume final de 50 µL, contendo 1x thermophilic DNA poly buffer (Promega), MgCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ (Promega), 100 µmol L⁻¹ de cada dNTP, 0,2 µmol L⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 40 ng de DNA e uma unidade de Taq DNA polimerase (Promega).

Após o término das reações, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %.

3.8- Análise da seqüência da ORF 1 Presente no Elemento Transponível *Boto*

A proteína deduzida a partir da seqüência de cDNA correspondente a segunda ORF presente no elemento transponível *Boto* foi comparada com seqüências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) usando o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997). Análises subsequentes das seqüências de DNA e proteína deduzida foram realizadas usando os programas CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) disponibilizado no pacote MEGA. O programa AUGUSTUS (Stanke et al., 2004) foi utilizado para a predição de genes e localização dos íntrons.

Para a comparação da proteína codificada pela ORF 1 de *Boto* foi utilizada a seqüência funcional da mesma (*M. perniciosus* EEB88797) e ORFs 1 de elementos *PIF/Harbinger* encontrados em *D. carota* (ABB83643), *Z. mays* (EU949209) e *A. thaliana* (NM_122608). Um consenso do regulador transcricional myb de plantas foi obtido por meio do alinhamento de três diferentes seqüências (*O. sativa* - AY398581; *A. thaliana* -NM_114482; e *Glicine max* - DQ822919).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Influência do Ciclo Sexual no Perfil de Integração do Elemento Transponível *Boto*

Para verificar se a passagem pelo ciclo sexual acarreta mudanças no perfil de integração do elemento *Boto*, presente no genoma de *M. perniciosus*, o isolado 1919, pertencente ao biótipo C, foi submetido ao ciclo sexual e seis isolados obtidos a partir de seus basidiósporos foram recuperados (P1 a P6). O DNA destes isolados foi utilizado para realização de experimentos de hibridização, sendo que o perfil de integração da progênie foi comparado ao do parental, a fim de detectar modificações no número ou na localização das diferentes cópias de *Boto* (Figura 3).

Ao comparar a progênie e o progenitor, nota-se que os isolados P1 e P3 não apresentam a banda correspondente ao fragmento de DNA de 8,99 kb, que é encontrado nos demais isolados utilizados no experimento, mas possuem dois fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda que lhes são únicos (bandas de 5,13 e 3,44 kb). Isto acarretou um acréscimo de uma cópia do elemento *Boto* nestes isolados, em comparação com os outros. Este aumento no número de cópias pode ser devido à ocorrência de transposição durante o processo replicativo, visto que este elemento transpõe por um mecanismo de excisão e integração, assim como todo elemento transponível da Classe II.

Entretanto, a observação de sete cópias de *Boto* nos isolados P1 e P3 pode ser devido à transposição de uma cópia deste elemento que, no parental, estava localizada em uma região do genoma cujo fragmento gerado quando clivado com a enzima de restrição *SaI* era de tamanho aproximado ao da localização de outro elemento transponível *Boto* e, com isso, identificado como sendo uma única cópia no parental. Quando esta cópia se transpôs para outro local do genoma, foi possível identificá-la nestes dois isolados.

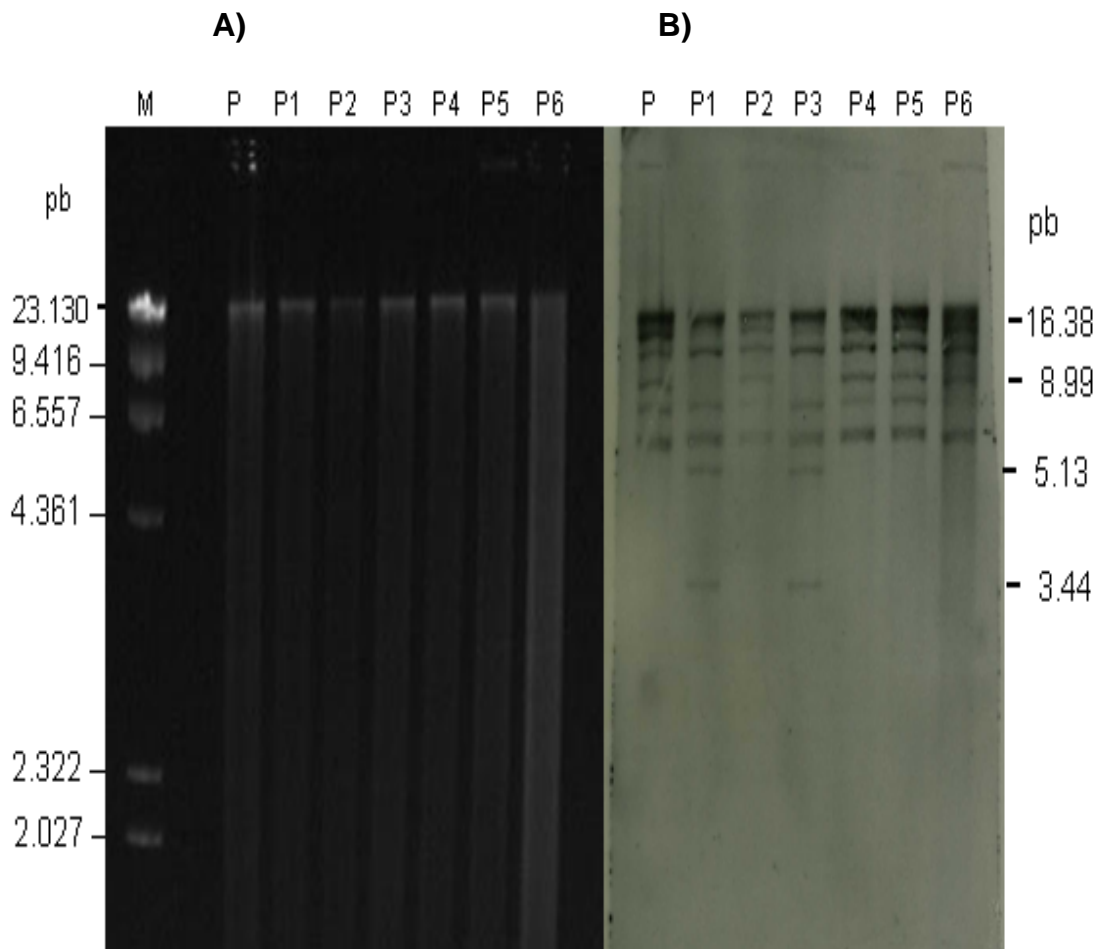


Figura 3. Análise do perfil de integração do elemento transponível *Boto* em isolados de *M. pernicioso* submetidos ao ciclo sexual. **A)** Eletroforese em gel de agarose (0,7%) do DNA total dos isolados obtidos por meio do ciclo sexual de *M. pernicioso* (1919 1.2 à 1919 1.9) e também do progenitor (1919) clivados com a enzima de restrição *SaI*. **B)** Hibridização dos isolados utilizando como sonda um fragmento de 795 pb contendo parte da região que codifica a transposase do elemento *Boto*. O tamanho e a posição dos fragmentos de DNA apresentados à direita estão discutidos no texto. M: marcador Lambda/*Hind* III.

O isolado P6 possui cinco cópias do elemento *Boto*, não apresentando o fragmento de DNA de cerca de 7,24 kb que hibridizou com a sonda usada. Esta ocorrência de redução no número de cópias identificadas pode ter sido devido a uma transposição incompleta, onde o elemento *Boto*, presente no fragmento de 7,24 kb, se excisou, mas não conseguiu integrar no genoma hospedeiro ou, ainda, ser devido à transposição desta cópia de *Boto* para um novo local no genoma, cujo fragmento formado foi de tamanho semelhante a outro fragmento de DNA que também possuía *Boto*. Uma outra alternativa é a ocorrência de recombinação entre duas cópias de *Boto*, presentes no mesmo cromossomo, que pode levar à perda da seqüência entre os elementos e de uma das cópias.

Alteração no perfil de integração de elementos transponíveis após o ciclo sexual ou indução por outras fontes de estresse é bem relatado na literatura (Labrador et al., 1999; Ikeda et al., 2001; Bouvet et al., 2008). A perda de cópias de elementos transponíveis durante evento de transposição também foi observada por Bouvet e colaboradores (2008) para os transposons OPHIO1 e OPHIO2 presentes nos fungos fitopatogênicos *O. ulmi* e *O. novo-ulmi*, quando os mesmos foram submetidos a estresse por choque térmico.

Embora estes resultados, quando analisados isoladamente, não possam provar a atividade de *Boto*, eles corroboram com os obtidos por Pereira (2005) no tocante a provável atividade deste elemento e, ainda, inserem o elemento *Boto* como um agente promotor de variabilidade genética encontrada em *M. pernicioso*, podendo, portanto, ter papel importante na plasticidade do genoma do hospedeiro devido sua capacidade de gerar a reestruturação do genoma deste fungo.

4.2 Detecção da atividade do elemento transponível *Boto* por meio da obtenção de seus sítios de inserção

De posse do conhecimento de que *Boto* é, possivelmente, um elemento transponível ativo no genoma de *M. pernicioso*, foi utilizada a técnica de PCR a fim de analisar os sítios de inserção deste elemento.

O uso de PCR para detecção da atividade de um elemento transponível se baseia na utilização de oligonucleotídeos, que anelam em regiões *upstream* e *downstream* ao elemento. No caso de *Boto*, foram utilizados os oligonucleotídeos *Boto 2.1* e *Boto 2.2* (Figura 2), e o tempo de extensão, em cada um dos ciclos, inferior ao necessário para amplificar todo o elemento. Desta maneira, só foi detectado o produto de amplificação naquelas regiões onde o elemento não estava presente (Figura 4, A e B). A ausência de *Boto* significa que ele já sofreu transposição para um novo local ou que, naquele isolado específico, *Boto* nunca esteve presente nesse sítio. Para todos os isolados analisados, foi realizado também um PCR controle (Figura 4C), utilizando-se oligonucleotídeos que amplificam um fragmento interno da transposase (CPORT1 e CPORT2).

Na Figura 4 (A e B) é possível observar produtos de amplificação de tamanho aproximado ao esperado de 185 pb, em caso de não inserção do elemento no genoma, em 14 isolados distribuídos entre os três biótipos de *M. perniciosus*. Para confirmar a ocorrência da transposição de *Boto* daquela região do genoma, ou mesmo a sua não inserção naquele local, produtos de amplificação dos diferentes biótipos, escolhidos ao acaso, foram clonados e sequenciados

A seqüência do DNA amplificado proveniente do isolado FA 607 mostrou a deleção de uma adenina, além da presença de somente um TAA (Figura 5). Estas podem ser as características do *footprint* do elemento *Boto*, neste isolado. Entretanto, embora a busca no banco de dados do projeto genoma de *M. perniciosus* confirme a presença desta adenina, esta deleção pode não ser oriunda da transposição deste elemento, uma vez que o isolado utilizado no sequenciamento do genoma de *M. perniciosus* não foi o mesmo para o qual foi obtido o produto de amplificação, o que torna possível que a ausência desta adenina seja uma característica do isolado FA 607.

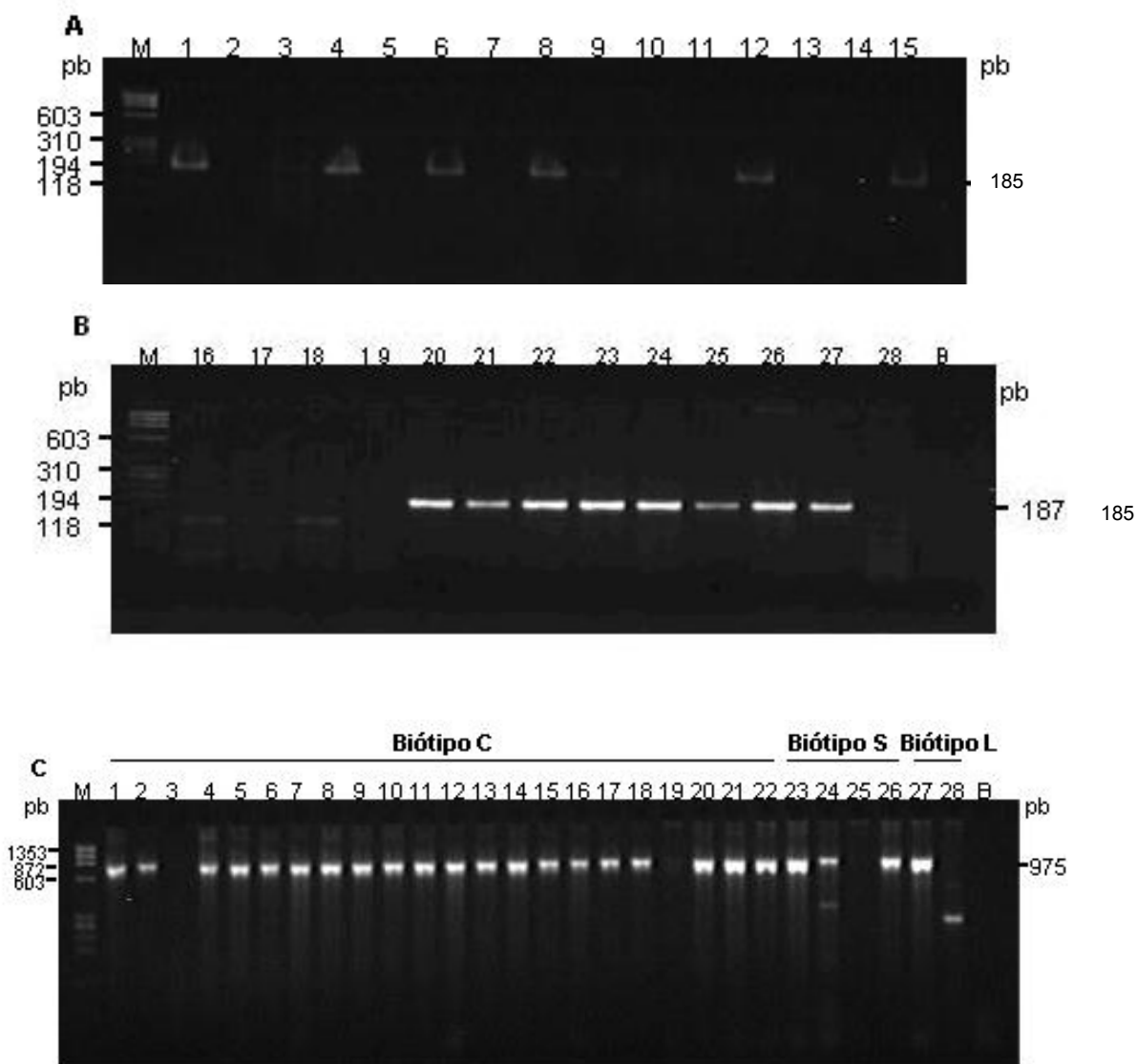


Figura 4. Análise por PCR para detecção de sítios de inserção do elemento transponível *Boto*. **A e B)** Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de PCR para detecção dos sítios de inserção do elemento transponível *Boto* utilizando o par de oligonucleotídeos *Boto* 2.1 e *Boto* 2.2. **C)** Amplificados obtidos com o par de primer CPORT 1 e CPORT 2 usados como controle da amplificação. M: marcador ϕ X 174/*Hae* III.

O seqüenciamento do produto de amplificação, obtido com a utilização de DNA proveniente do isolado SCL4, assim como o seqüenciamento do produto de amplificação, obtido com a utilização de DNA proveniente do isolado FA 607, demonstram a deleção de uma adenina e a presença de somente um TAA. Todavia, a seqüência do isolado SCL4 apresenta uma guanina em um local em que tanto o isolado FA 607 como na seqüência de referência (*Boto*, isolado CP02) está uma citosina. A troca de citosina por guanina foi observada por Hikosaka e colaboradores (2007) quando estes analisaram a atividade do elemento transponível *Tol1* em *Xenopus laevis*. No caso do elemento *Tol 1*, cerca de 61,5 % dos *footprints* analisados apresentavam transverso de uma citosina para uma guanina. Entretanto, a modificação encontrada no sítio de inserção de *Boto* não ocorreu na seqüência TAA. Assim como para o isolado FA 607, é provável que as modificações encontradas próximo ao sítio de inserção (TAA) de *Boto* no isolado SCL4 não sejam resultado de alterações causadas pela excisão do elemento transponível *Boto*, mas sejam apenas uma característica do próprio isolado.

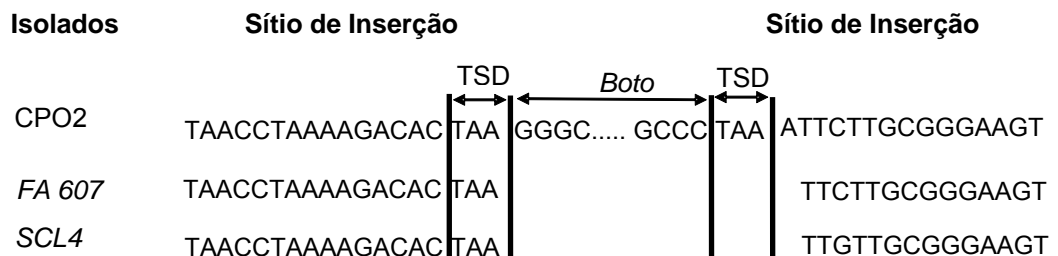


Figura 5: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos dos sítios de inserção do elemento transponível *Boto* e sua seqüência flanqueadora. *Boto* é a seqüência de referência, TSD é a duplicação do sítio-alvo. Espaços vazios indicam nucleotídeos que não são observados após a excisão do elemento transponível *Boto*. Está sublinhado o nucleotídeo que não é encontrado na seqüência de referência.

Entretanto, somente o fato de não haver inserção do elemento *Boto* em alguns isolados, conforme comprovado nos isolados FA607 e SCL4,

indica a atividade deste elemento em algum momento do período evolutivo no genoma de *M. pernicioso*, uma vez que uma cópia do elemento *Boto* foi identificada nesta mesma posição no genoma do isolado CP02.

Além disso, a presença de produtos de amplificação, quando se utilizou DNA proveniente de isolados dos três diferentes biótipos de *M. pernicioso*, corrobora com as observações de Pereira (2005), que por meio de hibridização de isolados dos três biótipos, com uma sonda contendo o fragmento interno da transposase de *Boto*, observou variação no número de cópias e distribuição deste elemento nos diferentes biótipos inferindo, assim, inferiu que *Boto* era um elemento transponível ativo em *M. pernicioso*.

4.3 Expressão e caracterização da ORF 1 presente no elemento transponível *Boto*

Uma análise detalhada da ORF 1 em *M. pernicioso* foi feita na tentativa de avaliar a presença de íntrons. A análise da seqüência, utilizando-se o programa AUGUSTUS, revelou que esta ORF possui 1.090 pb e é interrompida por dois íntrons, o primeiro com 55 pb e o segundo com 48 pb. Ao retirar os íntrons desta seqüência, é possível deduzir uma proteína putativa de 328 resíduos de aminoácidos.

Busca realizada no GenBank para localizar proteínas com seqüências similares à proteína deduzida da ORF 1, utilizando-se o algoritmo Blastp, revelou a presença de uma proteína putativa de *M. pernicioso* (Número de acesso: EEB88797), que apresenta alta similaridade com a proteína utilizada na busca (E-value 2^{-180}). Análise da proteína encontrada no GenBank (EEB88797) indica que esta é, provavelmente, uma proteína codificada pela ORF 1 de uma outra cópia do elemento transponível *Boto*, denominada *Boto 2*.

Apesar da alta similaridade, a proteína codificada pela ORF 1 de *Boto 2* é maior do que a proteína deduzida por meio do programa AUGUSTUS com base na seqüência de nucleotídeos da ORF 1 de uma outra cópia do elemento *Boto*, denominada *Boto 1*. Tal fato é devido à inserção de duas timinas na ORF 1 do elemento *Boto 1* que gerou codon de parada prematuro na seqüência, visto que a seqüência de nucleotídeos posterior ao primeiro

codon de parada da ORF 1 do elemento *Boto 1* apresenta alta identidade com o restante da seqüência de nucleotídeos da ORF 1 de *Boto 2* (Figura 6).

Para comprovar a presença destes íntrons na seqüência da ORF 1 de *Boto 1*, bem como de detectar se esta ORF é realmente expressa, foi realizado RT-PCR com dois conjuntos de oligonucleotídeos (*Boto2ORFF1 - Boto2ORFR1* e *Boto2ORFF2 - Boto2ORFR2*). A amplificação do cDNA obtido demonstrou que esta ORF é expressa mesmo em condições normais de cultivo do fungo (Figura 7). O produto de PCR obtido, quando se utilizou o primeiro par de oligonucleotídeos, evidenciou a presença de um íntron. Além disso, quando o segundo conjunto de oligonucleotídeos foi utilizado, o tamanho do fragmento obtido a partir da amplificação do cDNA, de acordo com cálculos realizados por meio do programa Kbcalc, foi de cerca de 0,72 kb enquanto o obtido por amplificação do DNA foi de 0,85 kb. Esta diferença no número de pares de base desses fragmentos ocorre devido à presença dos dois íntrons encontrados nestas seqüências.

A presença de dois íntrons na ORF 1 não é usual entre os elementos *PIF/Harbinger*, sendo que para a maioria dos elementos foi relatada a presença de um único íntron (Zhang et al., 2004; Grzebelus et al, 2006; Grzebelus & Simon, 2008).

Para a confirmação da presença destes dois íntrons, o fragmento de cDNA obtido com a utilização do segundo conjunto de oligonucleotídeos foi clonado em vetor pGEM e sequenciado. No sequenciamento, foi confirmada a presença dos dois íntrons inferidos pelo programa AUGUSTUS, sendo a posição dos mesmos idênticas, tanto na seqüência da ORF 1 de *Boto 1* quanto na seqüência da ORF 1 de *Boto 2*.

Com base na comparação entre as seqüências da ORF 1 presente nas duas cópias do elemento transponível *Boto*, sugere-se que a ORF 1 presente no elemento *Boto 1* seja defectiva devido à inserção de duas timinas em sua seqüência, o que acarretou a formação de um codon de parada prematuro. A ORF 1 funcional do elemento *Boto*, caracterizada no elemento *Boto 2*, possui 1.372 pb e codifica uma proteína de 422 resíduos de aminoácidos (Figura 8).

```

Seqüência ORF 1 Boto 1 ATGGGAAGGAAGGGTACCAGCTCCAGAAATGCCAAGAAAAAGGACAAGTCTTCGGCAACCAATGAGAAGAAACTAC
Seqüência ORF 1 Boto 2 ATGGGAAGGAAGGGTACCAGCTCCAGAAATGCCAAGAAAAAGGACAAGTCTTCGGCAACCAATGAGAAGAAACTAC
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 GTGCCGTATGGTCCGATGCTGATGAAGAAAAGCTTCTCCAAGGACTTGTGTAACGCGTGTTCGAGGATCTCAGAGGG
Seqüência ORF 1 Boto 2 GTGCCATATGGTCCCATGCTGATGAAAAAACCTTCTCCAAGACTTGTGTAACGCGTGTCCAGGATCTCAAAGGG
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 CGGGAATTTTCAGGCTTGTAGTATTGAACGAGGTTGCCGAGACACTCAATCCACCTGCCAGTGGTGGAGATAAGATG
Seqüência ORF 1 Boto 2 CGGGAATTTTCAGGCTTGTAGTATTGAACGAGGTTGCCGAGACACTCAATCCACCTGCCAGTGGTGGAGATAAGATG
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 GGGAAAGGATGCAAGGACAAATATGGCACTgtacgtgatactctatattttctggcaccactcatcaatttcct
Seqüência ORF 1 Boto 2 GGGAAAGGATGCAAGGACAAATATGGCACT-----
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 gtttgcagATCAAACGTGACTGGGAAGAAGTCATCAAAATTAACCATAAGTCTGGATGGCCTCCATGGGACCGGCT
Seqüência ORF 1 Boto 2 -----ATCAAACGTGACTGGGAAGAAGTCATCAAAATTAACCATAAGTCTGGATGGCCTCCATGGGACCGGCT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 ACTTGGTGCAAACATCACGCCCGAACGCGAGAACAACCTGGAACGAGTATGTTAAGGCCAACCCGAGGGCAGCTCCT
Seqüência ORF 1 Boto 2 ACTTGGTGCAAACATCACGCCCGAACGCGAGAACAACCTGGAACGAGTATGTTAAGGCCAACCCGAGGGCAGCTCCT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 TTCCGGAACAAGGGTTACAAGTACCAGGAGTATTTTGACGTGCTTATGCCTCTGGATACTACCCTTCCAAAGCAGT
Seqüência ORF 1 Boto 2 TTCCGGAACAAGGGTTACAAGTACCAGGAGTATTTTGACGTGCTTATGCCTCTGGATACTACCCTTCCAAAGCAGT
*****

```

```

Seqüência ORF 1 Boto 1 TGAATGTATGTCGTATTGGCAGGAAGAAGGCTGGGATACAGGGCAGTGATGAGGAGGATGTTGAGGAAAAGTCAGT
Seqüência ORF 1 Boto 2 TGAATGTATGTCGTATTGGCAGGAAGAAGGCTGGGATACAGGGCAGTGATGAGGAGGATGTTGAGGAAAAGTCAGT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 GTCTGATGGAGCTCAAGAGGGTGTGGGGGATGAAGGTGAAGTGAAGAGAAGGTGGGAGGGCAGGAAAAGTCCCAT
Seqüência ORF 1 Boto 2 GTCTGATGGAGCTCAAGAGGGTGTGGGGGATGAAGGTGAAGTGAAGAGAAGGTGGGAGGGCAGGAAAAGTCCCAT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 CTGCCACTCACCCGGAGAGCCAGTGCTGAGTGGGACTTCAGTCTGATGAGTCAGCAGCTTGGAGCAGAAGATGAAT
Seqüência ORF 1 Boto 2 CTGCCACTCACCCGGAGAGCCAGTGCTGAGTGGGACTTCAGTCTGATGAGTCAGCAGCTTGGAGCAGAAGATGAAT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 CTAACCCAGCTGGAGCTATAGtgagtataataatattataaaaggcattttattcacaagatttctacaggATACATC
Seqüência ORF 1 Boto 2 CTAACCCAGCTGGAGCTATAG-----ATACATC
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 GAATGCTACCACTACAGCTGACTCAGCTAGTACTGGTTCGGAAGCGTGGTGCATCGGAGACGCCACTCCCTAAGGAG
Seqüência ORF 1 Boto 2 GAATGCTACCACTACAGCTGACTCAGCTAGTACTGGTTCGGAAGCGTGGTGCATCGGAGACGCCACTCCCTAAGGAG
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 AAGACCTTGGAGAAGCGTGTCAAATCACAGACTCCTGTTACACCTGTTCCCTCGCCACGAACGTCCATCAGCCTCCT
Seqüência ORF 1 Boto 2 AAGACCTTGGAGAAGCGTGTCAAATCACAGACTCCTGTTACACCTGTTCCCTCGCCACGAACGTCCATCAGCCTCCT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 CCGATCTCCGTGCCAAGGCTGCTACTGCACTTGAGCAAATAGGCAGTGGTGTACCCGAGTTCAATCAGCGTGCTTT
Seqüência ORF 1 Boto 2 CCGATCTCCGTGCCAAGGCTGCTACTGCACTTGAGCAAATAGGCAGTGGTGTACCCGAGTTCAATCAGCGTGCTTT
*****

```

```

Seqüência ORF 1 Boto 1 TTGCACTGTTTGGCTCTGCTGGTAAGCAACAGAATGACACCCCTGGGCGTCTTGCTGGTGCTATTAAAGCTATGGA
Seqüência ORF 1 Boto 2 T-GCACTGTTTGGCTCTGCTGGTAAGCAACAGAATGACACCCCTGGGCGTCTTGCTGGTGCTATTAAAGCTATGGA
* *****

Seqüência ORF 1 Boto 1 TAATGTAAAAGGTTTGGCTACCGTTGGATCTTCGGCTTCAGCTTCAGGACCTGTTGGAGAAGGATAAGGCTGCAGT
Seqüência ORF 1 Boto 2 TAATG-AAAAGGTTTGGCTACCGTTGGATCTTCGGCTTCAGCTTCAGGACCTGTTGGAGAAGGATAAGGCTGCAGT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 AGTAACATATTGCAATATGGACCCAGATGATAAACTATTCCGAAGGAGATGGATTCTCCGAAAGCTCAATGTTCCCT
Seqüência ORF 1 Boto 2 AGTAACATATTGCAATATGGACCCAGATGATAAACTATTCCGAAGGAGATGGATTCTCCGAAAGCTCAATGTTCCCT
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 GTTCCTGATGGTCATGACCTGCTTTCAGATACCTTGCTACCCATTACTCCATTTCGGCTACTATCTTCCTTCATTCA
Seqüência ORF 1 Boto 2 GTTCCTGATGGTCATGACCTGCTTTCAGATACCTTGCTACCCATTACTCCATTTCGGCTACTATCTTCCTTCATTCA
*****

Seqüência ORF 1 Boto 1 ATTAG
Seqüência ORF 1 Boto 2 ATTAG
*****

```

Figura 6: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da ORF 1 das cópias *Boto 1* e *Boto 2* do elemento transponível *Boto*. Os asteriscos representam nucleotídeos idênticos nas duas cópias de *Boto*. Os nucleotídeos em minúsculo representam a seqüência dos íntrons que só é mostrada em *Boto 1*. Em negrito, as duas timinas que estão presentes na seqüência da ORF 1 de *Boto 1* e são responsáveis pelo codon de parada prematuro na proteína codificada pela ORF 1 desta cópia do elemento transponível *Boto*.

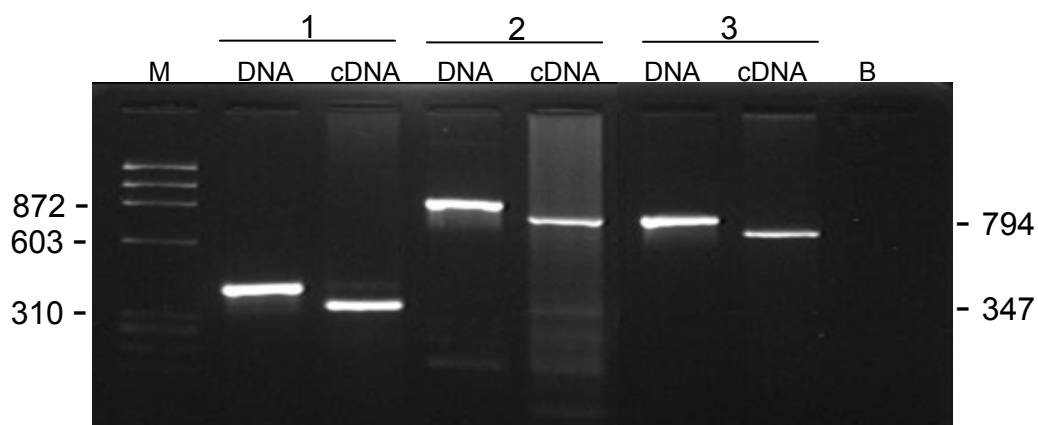


Figura 7: RT-PCR demonstrando a expressão e a presença de íntrons na segunda ORF do elemento transponível *Boto*. M: marcador PhiX 174/*Hae*III, 1: Primers *Boto2ORFF1* e *Boto2ORFR1*, 2: Primers *Boto2ORFF2* e *Boto2ORFR2*, 3: Primers CPORT1 e CPORT2, B: Controle negativo.

Todavia, o fato de *Boto 1* possuir a ORF 1 defectiva não impossibilita a transposição da mesma, visto que esta cópia pode usar a proteína codificada por uma outra cópia de *Boto* presente no genoma de *M. perniciosus* para realizar a transposição.

A sequência da proteína codificada pela ORF 1 da maioria dos elementos PIF/Harbinger possui baixa similaridade com proteínas reguladoras da transcrição de plantas do tipo *myb*. Para verificar a presença deste domínio conservado na proteína codificada pela ORF 1 do elemento transponível *Boto*, foi realizada busca no programa CD-search (Marchler-Bauer and Bryant, 2004), utilizando-se a proteína da ORF2 funcional (EEB88797). No entanto, nenhum domínio conservado foi encontrado nesta proteína.

O alinhamento da sequência da ORF 1 de *Boto 2* foi realizado, juntamente com a ORF 1 de mais três integrantes da superfamília PIF/Harbinger: *Zm PIF* (*Z. mays* ACG44320.1), *At PIF* (*A. thaliana* NM_122608), *DcMaster-a ORF 1* (*D. carota* ABB83643) com sequência-consenso *myb*, obtida por meio do alinhamento de três diferentes sequências

de fatores transcricionais myb de plantas (*O. sativa* - AY398581; *A. thaliana* - NM_114482; and *G. max* - DQ822919). O alinhamento destas seqüências mostrou algumas similaridades entre a proteína codificada pela ORF 1 de *Boto 2* com seqüências codificadas pela ORF 1 de outros elementos e também com a seqüência consenso do regulador transcrição myb (Figura 9).

Zhang e colaboradores (2004) identificaram duas regiões conservadas, denominadas A e B, nas proteínas codificadas pelas ORFs 1 dos elementos *PIF/Harbinger* analisados. Embora ambas as regiões estejam presentes no elemento transponível *Boto*, a região B apresenta pouca similaridade com a identificada por esses autores.

A)

ATGGGAAGGAAGGGTACCAGCTCCAGAAATGCCAAGAAAAAGGACAAGTCTTCGGCAACCAATGAGAAGAACTACGTGCCGTATGGTCCGATGCTGATGAAGAAAAGCT
TCTCCAAGGACTTGTGTAACGCGTGTTCGAGGATCTCAGAGGGCGGGAATTTTCAGGCTTGTAGTATTGAACGAGGTTGCCGAGACACTCAATCCACCTGCCAGTGGTGGAG
ATAAGATGGGGAAAGGATGCAAGGACAAATATGGCACTgtacgtgatactctatttatttctggcaccactcatcaatttcctcgtttgagATCAAACGTGACTGGGA
AGAAGTCATCAAAATTAACCATAAGTCTGGATGGCCCTCCATGGGACCGGCTACTTGGTGCAAACATCACGCCCGAACGCGAGAACAACCTGGAACGAGTATGTTAAGGCCA
ACCCGAGGGCAGCTCCTTTCCGGAACAAGGGTTACAAGTACCAGGAGTATTTTGACGTGCTTATGCCTCTGGATACTACCCTTCCAAAGCAGTTGAATGTATGTCGTATT
GGCAGGAAGAAGGCTGGGATACAGGGCAGTGATGAGGAGGATGTTGAGGAAAAGTCAGTGTCTGATGGAGCTCAAGAGGGTGTGGGGGATGAAGGTGAAGTGAAGAGAA
GGTGGGAGGGCAGGAAAAGTCCCATCTGCCACTCACCCGGAGAGCCAGTGCTGAGTGGGACTTCAGTCTGATGAGTCAGCAGCTTGGAGCAGAAGATGAATCTAACCAG
CTGGAGCTATAGtgagtataatataataaaggcattttattcacaagatttctacaggATACATCGAATGCTACCACTACAGCTGACTCAGCTAGTACTGGTCCGGAAG
CGTGGTGCATCGGAGACGCCACTCCCTAAGGAGAAGACCTTGGAGAAGCGTGTCAAATCACAGACTCCTGTTACACCTGTTCCCTCGCCACGAACGTCCATCAGCCTCCTC
CGATCTCCGTGCCAAGGCTGCTACTGCACCTTGAAGCAAATAGGCAGTGGTGTCAACGAGTTCAATCAGCGTGCCTTTTTGCACTGTTTGGCTCTGCTGGTAAGCAACAGAAT
GACACCCCTGGGCGTCTTGGCTGGTGCATATTAAGCTATGGATAATGTAAGGTTTGGCTACCGTTGGATCTTCGGCTTCAGCTTCAGGACCTGTTGGAGAAGGATAAGG
CTGCAGTAGTAACATATTGCAATATGGACCCAGATGATAAACTATTCCGAAGGAGATGGATTCTCCGAAAGCTCAATGTTCTGTTCTGATGGTTCATGACCTGCTTTCA
GATACCTTGCTACCCATTACTCCATTCGGCTACTATCTTCCTTCATTCAATTAG

B)

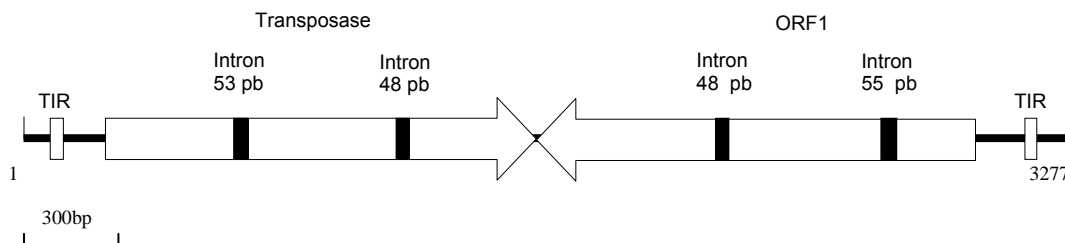


Figura 8: **A)** Seqüência da ORF 1 do elemento transponível *Boto 2*. Sublinhado estão os codons de iniciação e terminação. Em minúsculo os dois íntrons encontrados nesta ORF. **B)** Esquema do elemento transponível *Boto* indicando suas duas ORFs. O sentido de tradução das ORFs é indicado pela direção das setas. Introns são indicados pelos retângulos pretos.

A

Consenso myb	RKG---PWTEQED LV FV LFG R-----RWD----F AKV ---R GKSCRLRWVNYL-----HPGL
Boto	KSG---WPPWDRLLGANITPERENN-----WNEYVKANPRAAPFRNKGYKYQEYFDVLMPLDTTLPKQL
Master	TSKTKAKWTLNTHIFCDVCISAINKGLRPSTHFNSEGWKFVVSNFQKLSGLNYEKPCLKNKWDLMR-----SEWK
At PIF	KKGDYNPWSPEETKLLVQLLEGINN-----NWRDSNGTISKLTVETKFMPEINKEFCRSK-----NYNH
Zm PIF	MEEDNADWCDENVKIACEIFAEEVRAKNRSGSHLNKLGYNVVMVKFKERTGKTYSELOFKNKWDKLK-----KDYS

B

Consenso myb	KRG M P EER V LH K GNR WS IA PGRTDNEIKNYWRT RK
Boto 2	NVCRIGRKKAGIQGSDEEDVEEKSVSDGAQEGVGDEGEVEEKVGGQEKSHLPL
Master	LWKELIGKETGLGWDPRLETVDASP-DWWKAKIQMNKEYARFQKKGIDPDIVS
At PIF	YLSRMKYLKIQYQSCLDLQRFSSGF-GWDPLTKRFT-ASDEVWSDYLKAHPNN
Zm PIF	NWKQLG-KETGCGWDPNKKLYVAPD-WWWEKANIQFKGISKFKDKSLQNAEEL

Figura 9: Alinhamento das proteínas codificadas pela ORF 1 de *Boto 2* (EEB88797), *Master* (ABB83643), *Zm-PIF* (EU949209), *At-PIF* (NM_122608) com consenso obtido pelo alinhamento de três distintos fatores de transcrição myb (*Oryza Sativa* - AY398581; *Arabidopsis thaliana* -NM_114482; and *Glycine max* - DQ822919). Regiões em cinza mostram resíduos conservados entre as seqüências analisadas.

5- CONCLUSÕES

Ciclo sexual alterou o perfil de integração do elemento transponível *Boto*

A atividade de *Boto* foi confirmada pela análise dos sítios de inserção de uma das cópias do elemento em diferentes isolados

ORF 1 de *Boto* apresenta dois íntrons e é expressa mesmo em condições normais de cultivo do fungo. A presença de códon de parada prematuro na seqüência da ORF 1 de *Boto* não é impedimento para a transposição desta cópia de *Boto*.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIME, M. C., MORA, W. P. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia** 97: 1012-1022.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, 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 Research** 25: 3389-3402.
- ANDEBRHAN, T., FURTEK, D. B. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology** 43: 1020-1027.
- ANDEBRHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMANDA, M. M., CASCARDO, J., FURTEK, D. B. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 105: 167-175.
- ARRUDA, M. C. C., MILLER, R. N. G., FERREIRA, M. A. S. V, FELIPE, M. S. S. 2003. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprint. **Plant Pathology** 52: 236-244.
- BASTOS, C. N., EVANS, H. C. 1985. A new biotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches's broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology** 34: 306-312.
- BASTOS, C. N., ANDERBHRAN, T., ALMEIDA, L. C. 1988. Comparações morfológica e patológica de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira** 13: 202-206.

- BENJAMIN, B., YVES, B., CORINNE, A. G. 2007. Assembly of the Tc1 mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. **Genética** 130: 105-120.
- BOUVET, G. F., JACOBI, V., PLOURDE K. V., BERNIER L. 2008. Stress-induced mobility of OPHIO1 and OPHIO2, DNA transposons of Dutch elm disease fungi. **Fungal Genetics and Biology** 45: 565-578
- CAPY, P., GASPERI, G., BIÉMONT, C., BAZIN, C. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity** 85: 101-106
- CHALVET, F., GRIMALDI, C., KAPER, F., LANGIN,T., DABOUSSI, M. J. 2003. *Hop*, an active Mutator-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Biology and Evolution** 20:1362–1375.
- CHEN, S., LI, X. 2007. Molecular characterization of the first intact Transib transposon from *Helicoverpa zea*. **Gene** 408: 51– 63.
- CODON, A. C., BENÍTEZ, T., KORHOLA, M. 1997. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. **Current Genetics** 32: 247-259.
- COGONI, C. 2001. Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. **Annual Review of Microbiology** 55:381–406.
- COLOT, V., VIVKI, H., ROSSIGNOL, J. L. 1998. Extensive, nonrandom diversity of excision footprints generated by Ds-like transposon Ascot-1 suggest new parallels with V(D)J recombination. **Molecular and Cellular Biology** 18:4337-4346.
- CROUCH, J. A., GLASHEEN, B. M., GIUNTA, M. A., CLARKE, B. B., HILLMAN, B. I. 2008. The evolution of transposon repeat-induced point

- mutation in the genome of *Colletotrichum cereale*: Reconciling sex, recombination and homoplasmy in an “asexual” pathogen. **Fungal Genetics and Biology** 45:190-206
- DABOUSSI, M. J. 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetics** 100:253-260.
- DABOUSSI, M. J., CAPY, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology** 57:275-299.
- DeMARCO, R., VENANCIO, T. M., ALMEIDA, V. 2006. SmTRC1, a novel *Schistosoma mansoni* DNA transposon, discloses new families of animal and fungi transposons belonging to the CACTA superfamily. **BMC Evolutionary Biology** 6:89
- De QUEIROZ, M. V. & DABOUSSI, M. J. 2003. Impala, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. **FEMS Microbiology Letters** 218: 317-321
- DING, S., WU, X., LI, G., HAN, M. ZHUANG, Y., XU, T. 2005. Efficient transposition of the piggyback (PB) transposon in mammalian cells and mice. **Cell** 122: 322-325.
- EBINA, H., LEVIN, H. L. 2007. Stress Management: How cells take control of their transposons. **Molecular Cell** 27:180-181.
- EISEN, J. A., BENITO, M. I, WALBOT, V. 1994. Sequence similarity of putative transposases links the maize Mutator autonomous element and a group of bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research** 22: 2634–2636.
- EMELYANOV, A. GAO, Y., NAQVI, N. I., PARINOV, S. 2006. Trans-Kingdom transposition of the maize dissociation element. **Genetics** 174: 1095-1104.

- ETO, Y., IKEDA, K., CHUMA, I., KATAOKA, T., KURODA, S., KIKUCHI, N., DON, L. D., NAKAYASHIKI, S., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pycularia* and their activity during and after the sexual cycle. **Molecular Genetics and Genomics** 264: 565-577.
- FESCHOTTE, C. JIANG N., WESSLER, S. R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. **Nature Review Genetics** 3:329–341.
- FESCHOTTE, C. 2004. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 Insertion Sequences. **Molecular Biology and Evolution** 21:1769-1780.
- FESCHOTTE, C. 2006. The *piggyBac* transposon holds promise for human gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 103: 14981-14982.
- FESCHOTTE, C. PRITHLAM, E. J. 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics** 41: 331-368.
- FINNEGAN, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics** 5:103–107.
- FIRON, A., VILLALBA, F., BEFFA, R., D'ENFERT, C. 2003. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryotic Cell** 2:247-255.
- FU, J., WENZEL, S. C., PERLOVA, O., WANG, J., DROSS, F., TANG, Z., YIN, Y., STEWART, F., MÜLLER, R., ZHANG, Y. 2008. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene cluster into heterologous hosts by transposition. **Nucleic Acids Research** 36: e113.

- GOFFEAU, A., BARREL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEK, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H. W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSSEN, P., TETTELIN, H., OLIVER, S. G. 1996. Life with 6000 genes. **Science** 274:562-567.
- GOODWIN, T. J. D., BUTLER, M. I., POULTER, R. T. M. 2003. Cryptons: a group of tyrosine-recombinase encoding DNA transposons from pathogenic fungi. **Microbiology** 149: 3099–3109
- GRAMACHO, K. P., RISTERUCCI, A.M., LANAUD, C., LIMA, L. S., LOPES, U. V. 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Ecology Notes** 7:153–155.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. 1994a. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity** 71:278-289
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. 1994b. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytologist** 127: 243-259.
- GRZEBELUS, D., YAU, Y. Y., SIMON, P. W. 2006. *Master*: a novel family of *PIF/Harbinger*-like transposable elements identified in carrot (*Daucus carota* L.). **Molecular Genetics and Genomics** 275: 450-459.
- GRZEBELUS, D., LASOTA, S., GAMBIN, T., KUCHEROV, G., GAMBIN, A., 2007. Diversity and structure of *PIF/Harbinger*-like elements in the genome of *Medicago truncatula*. **BMC Genomics** 8: 409.
- GRZEBELUS, D. & SIMON, P. W. 2008. Diversity of DcMaster-like elements of the *PIF/Harbinger* superfamily in the carrot genome. **Genetica**

- HIKOSAKA, A. & KOGA, A. 2007. PCR detection of excision suggests mobility of the medaka fish *To1* transposable element in the frog *Xenopus laevis*. **Genetical Research** 89: 201-206.
- HOLLISTER, J. D., GAUT, B. S. 2007. Population and evolutionary dynamics of *Helitron* transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Biology and Evolution** 24: 2515-2524.
- HUA-VAN, A., PAMPHILE, J. A., LANGIN, T., DABOUSSI, M. J. 2001. Transposition of autonomous and engineered impala transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. **Molecular and General Genetics** 264: 724-731.
- IKEDA, K., NAKAYASHIKI, H., TAKAGI, M., TOSA, Y., MAYAMA, S. 2001. Heat shock, cooper sulfate and oxidative stress active the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 266: 318-325
- JURKA, J. & KAPITONOV V. V. 2001. *PIFs* meet *Tourists* and *Harbingers*: a superfamily reunion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 98: 12315-12316.
- KANG, S., LEBURN, M. H., FARRALL, L., VALENT, B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14: 671–674.
- KAPITONOV, V. V. & JURKA, J. 1999. Molecular paleontology of transposable elements from *Arabidopsis thaliana*. **Genetica** 107:27-37.
- KAPITONOV, V. V. & JURKA, J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 98: 8714-8719.

- KAPITONOV, V. V. & JURKA, J. 2005. RAG1 Core and V(D)J Recombination Signal Sequences Were Derived from Transib Transposons. **PLoS BIOLOGY** 3: 998-1011.
- KAPITONOV, V. V. & JURKA, J. 2006. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 103:4540-4545.
- KAPITONOV, V. V. & JURKA, J. 2007. *Helitrons* on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. **TRENDS in Genetics** 23: 521-529.
- KEMPKEN, F. & KÜCK, U. 1996. *restless*, an Active *Ac*-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. **Molecular and Cellular Biology** 16: 6563–6572
- KEMPKEN, F., JACOBSEN, S., KÜCK, U. 1998. Distribution of the fungal transposon *restless*: full-length and truncated copies in closely related strains. **Fungal Genetics and Biology** 25: 110–118.
- KEMPKEN, F. & KÜCK, U. 2000. Tagging of a nitrogen pathway-specific regulator gene in *Tolypocladium inflatum* by the transposon *Restless*. **Molecular and General Genetics** 263: 302-308.
- KIDWELL, M. G., LISCH, D. R. 1997. Transposable elements as source of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 94: 7704-7711.
- KIDWELL, M. G. & LISCH, D. R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution** 15: 95-99.
- KIKUOCHI, K., TERAUCHI, K., WADA, M., HORANO, H. Y., 2006. The plant MITE mPing is mobilized in anther culture. **Nature** 421:12315–12316.

- LABRADOR, M., FARRE, M., UTZEL, F., FONTDEVILA, A. 1999. Interspecific Hybridization Increases Transposition Rates of *Osva1do*. **Molecular Biology and Evolution** 16: 931-937
- LEEWEN, H., MONFORT, A., PUIGDOMENECH, P. 2007. *Mutator*-like elements identified in melon, Arabidopsis and rice contain ULP1 protease domains. **Molecular Genetics and Genomics** 277: 357-364.
- LI, K. T., LIN, Y. L., HUANG, J. Y., LI, W. Y., CHARNG, Y. C. 2008 A one-time inducible transposons for creating knockout mutants. **Molecular Breeding** 22: 85-94.
- LISCH, D. R., M. FREELING, R. J. LANGHAM, AND M. Y. CHOY. 2001. Mutator transposase is widespread in the grasses. **Plant Physiology** 125: 1293–1303.
- MARCHLER-BAUER, A., AND BRYANT, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research** 32:327-331.
- MASSON, P., STREM, M., FEDOROFF, N. 1991. The *tnpA* and *tnpD* gene products of the *Spm* element are required for transposition in Tobacco. **The Plant Cell** 3:79-85
- MATHIOPOLUS, K. D., TORRE, A., PREDAZZI, V., PETRARCA, V., COLUZZI, M. 1998. Cloning of inversion breakpoints in the *Anopheles gambiae* complex traces a transposable element at the inversion junction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 95: 12444–12449.
- MAXWELL, P. H. & CURCIO, M. J. 2007. Host factors that control long terminal repeat retrotransposons in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for regulation of mammalian retroviruses. **Eukaryotic Cell** 6:1069-1080.

MCCLINTOC, B. 1947. Cytogenetic studies of maize in *Neurospora*. Carnegie Institute, Washington Year Book 46: 146-152.

MESSING, J. & DOONER, H. K. 2006. Organization and variability of the maize genome **Current Opinion in Plant Biology**. 9:157–163

MIGHELI, Q., STEINBERG, C, DAVIÈRE, J.M., OLIVAIN, C., GERLINGER, C., GAUTHERON, N., ALABOUVETTE, C., DABOUSSI, M. J. 2000. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition. of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*. **Phytopathology** 90:1279-1284

MILLER, W. J., MCDONALD, J. F., NOUAUD, D., ANXOLABÉHÈRE, D. 1999. Molecular domestication – more than a sporadic episode in evolution. **Genetica** 107: 197–207.

Ministério da Agricultura, 2006.

http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2005/03.01.03_1.XLS

MOTAMAYOR J. C., RISTERUCCI A. M., LOPEZ P. A., ORTIZ C. F., MORENO A., LANAUD C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity** 89: 380–386.

NAKAJIMA, T., MATSUBARA, K., KODAMA, H., KOKBUN, H., WATANABE, H., ANDO, T. 2005. Insertion and excision of a transposable element governs the red floral phenotype in commercial petunias. **Theoretical and Applied Genetics** 110: 1038-1043.

NAKAYASHIKI, H., KIYOTOMI, K., TOSA, Y., MAYAMA, S. 1999. Transposition of the Retrotransposon MAGGY in Heterologous Species of Filamentous Fungi. **Genetics**. 153: 693–703

- NICOSIA, M. G. L. D, BROCARD-MASSON, C., DEMAIS S., HUA-VAN, A. L., DABOUSSI, M. J., SCAZZOCCHIO, C. 2001. Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**. 39:1330-1344.
- NUZHHDIN, S. V., PASYUKOVA, E. G., MACKAY, T. 1996. Positive association between *copia* transposition rate and copy number in *Drosophila melanogaster*. Proc. Royal Society London B. 823-831
- PARDUE, M. J. & DEBARYSHE, P. G. 1999. *Drosophila* telomeres: two transposable elements with important roles in chromosomes. **Genetica** 107: 189–196
- PENTON, E. H., SULLENDER, B. W., CREASE, T. J. 2002. *Pokey* a new DNA transposon in *Daphnia* (Cladocera: Crustacea). **Journal of Molecular Evolution** 55: 664-673.
- PEREIRA J. F. 2005. Caracterização, distribuição e estudo da atividade de elementos transponíveis em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueiro (*Theobroma cacao*). Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Viçosa. 182p.
- PEREIRA J. F., ARAÚJO, E. F., BROMMONSCHENKEL, S. H., QUEIROZ, M. V. 2006. Elementos transponíveis em fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 14: 303-362.
- PIEGU, B., GUYOT, R., PICAULT, N., ROULIN, A., SANIYAL, H. K., COLLURA, K., BRAR, D. S., JACKSON, S., WING, R. A., PANAUD, O. 2006. Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. **Genome Research** 16: 1262-1269.
- PIMPINELLI, S., BERLOCO, M., FANTIT, L., DIMITRI, P., BONACCORSI, S., MARCHETTI, E., CAIZZI, R., CAGGESE, C., GATRRI, M. 1995

- Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 92: 3804-3808.
- PRITHAM, E. J & FESCHOTTE, C. 2007. Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 104: 1895-1900.
- PRITHAM, E. J , PUTLIWALA, T., FESCHOTTE, C. 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. **Gene** 390: 3-17.
- RAMACHANDRAN, S., SUNDARESAN, Y. 2001. Transposons as tools for functional genomics. **Plant Physiology and Biochemistry** 39: 243-252.
- RESENDE, M. L. V., NOJOSA, G. B. A., SILVA, L. H. C. P., NIELA, G. R., CARVALHO, G. A., SANTIAGO, D. V. R., BEZERRA, J. L. 2000. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patógeno ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira** 25: 88-91.
- RYDER, E., RUSSELL, S. 2003. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics** 2: 57-71
- RINCONES, J., MEINHARDT L. W., VIDAL B. C., PEREIRA, G. A. G. 2003. Eletrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 107: 452-458.
- RINCONES, J., MAZOTTI, G. D. GRIFFITH G. W., POMELA, A., FIGUEIRA, A., LEAL, G. A., QUEIROZ, M. V., PEREIRA, J. F., AZEVEDO, R. A., PEREIRA, G. A. G., MEINHARDT, L. W. 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen

- Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research** 110: 821-832.
- ROS, F. & KUNZE, R. 2001. Regulation of *Activator/Dissociation* transposition by Replication and DNA Methylation. **Genetics** 157: 1723–1733
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F. N., NICKLEN, S., COULSON, A. R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 74: 5463-5467.
- SARKAR, A., SIM, C., HONG, Y. S., HOGAN, J. R., FRASER, M. J., ROBERTSIN, H. M., COLLINS, F. H. 2003. Molecular evolutionary analysis of the widespread *piggyBac* transposon family and related “domesticated” sequences. **Molecular Genetics and Genomics** 270: 173-180.
- SHINOHARA, E. T., KAMINSKI, J. M., SEGAL, D. J., PELCZAR, P., KOLHE, R., RYAN, T., COATES, C. J., FRASER, M. J., HANDLER, A. M., YANAGIMACHI, R., MOISYADI, S. 2007. Active integration: new strategies for transgenesis. **Transgenic Research** 16: 333-339.
- SILVA, J. C. 2006. Distribuição genômica e caracterização do elemento transponível *boto2* em isolados de *crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*theobroma cacao*). Monografia 32p.
- SILVA, J.R. Q., FIGUEIRA, A., PEREIRA, G. A. G, ALBUQUERQUE, P. 2008. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of the witches’ broom disease of *Theobroma cacao*. **Molecular Ecology Resources** 8: 783-785

- SPEACHT, C. A., DIRUSO, C. C., NOVOTNY, C. P., ULLRICH, R. C. 1982. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry** 119: 158-163.
- STANKE, M., AND MORGENSTERN, B. 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research** 33:W465-W467.
- SUFRAMA – Superintendência da Zona Franca de Manaus, 2003. Potencialidades Regionais – Estudo da viabilidade econômica – Cacau - 34pp.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., AND GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22:4673-44680.
- THON, M. R., PAN, H., DIENER, S., PAPALAS, J., TARO, A., MITCHELL, T. K., DEAN, R. A. 2006. The role of transposable element clusters in genome evolution and loss of synteny in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Genome Research** 7: R16.
- VILLALBA, F., LEBRUN, M. H., HUA-VAN, A., DABOUSSI, M. J., GROSJEAN-COURNOYER, M. C. 2001. Transposon impala, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14: 308-315
- WALKER, E. L., EGGLESTON, W. B., DEMOPULOS, D., KERMICLES, J., DELLAPORTA, S. L. 1997. Insertions of a novel class of transposable elements with a strong target site preference at the r locus of maize. **Genetics** 146: 681-693
- WANG, J., DU, Y., WANG, S., BROWN, S. J., PARK, Y. 2008 Large diversity of the piggyback-like elements in the genome of *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 38: 490-498.

- WEIL, C. F. & KUNZE, R. 2000. Transpositions of maize Ac/Ds transposable elements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Genetics** 25: 187-190.
- WICKER, T., SABOT, F., HUA-VAN, A., BENNETZEN, J. L., CAPY, P., CHALHOUB, B., FLAVELL, A., LEROY, P., MORGANTE, M., PANAUD, O., PAUX, E., SANMIGUEL, P., SCHULMAN, A. H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics** 8: 973-982
- WRIGHT, S., FINNEGAN, D. 2001. Genome evolution: Sex and the transposable element. **Current Biology** 11: 296-299
- WRIGHT, S. I., LE, Q. H., SCHOEN, D. J., BUREAU, T. F. 2001. Population dynamics of an Ac-like transposable element in self- and cross-pollinating *Arabidopsis*. **Genetics** 158: 1279-1288.
- WRIGHT, D. A., KE, N., SMALLET, J., HANGE, B., M., GOODMANT, H. M., VOYTAS, D. F. 2006. Multiple Non-LTR Retrotransposons in the Genome of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 142: 569-578.
- WU, S. C. Y., MEIR, Y. J. J., COATES, C. J., HANDLERS, A. M., PELCZAR, P., MOISYADI, S., KAMINSKI, J. M. 2006. *piggyBac* is a flexible and highly active transposon as compared to *Sleeping Beauty*, *Tol2*, and *Mos1* in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 103: 15008-15013.
- YANG, G., ZHANG, F., HANCOCK, C. N., WESLLER, S. R. 2007. Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element *mPing* in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 104: 10962-10967

ZHANG, X., FESCHOTTE, C., ZHANG, Q., JIANG, N., EGGLESTON, W.B., WESSLER, S.R. 2001. P instability factor: an active maize transposon system associated with the amplification of Tourist-like MITEs and a new superfamily of transposases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 98: 12572-12577.

ZHANG, X., JIANG, N., FESCHOTTE, C., WESSLER, S.R. 2004. PIF- and Pong-Like transposable elements: distribution, evolution and relationship with Tourist-Like miniature inverted-repeat transposable elements. **Genetics** 166: 971-986