

ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS MICROBIANOS E A ETIQUETAGEM GÊNICA

MICROBIAL TRANSPOSABLE ELEMENTS AND THE GENE TAGGING

LÍGIA MARIA CRUBELATI **BULLA**¹, JULIO CESAR **POLONIO**², CRISTIANE **BREDOW**³, VÂNIA APARECIDA **SACCO**⁴, SANDRO AUGUSTO **RHODEN**^{5*}, JOÃO LUCIO DE **AZEVEDO**⁶, JOÃO ALENCAR **PAMPFILE**⁷

1. Pós-graduanda em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 2. Pós-graduando em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 3. Pós-graduanda em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 4. Pós-graduanda em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 5. Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular; 6. Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental; 7. Professor Doutor e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular.

* Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná. CEP: 87020-900. sandro_ar@hotmail.com

Recebido em 25/03/2014. Aceito para publicação em 04/04/2014

RESUMO

Elementos transponíveis (ETs) são sequências de DNA dispersos no genoma, com característica de se transpor de um local para outro. Após 25 anos da descoberta dos ETs por Bárbara McClintock confirmou-se a existência desses elementos, com a utilização de técnicas moleculares, também verificou-se que os ETs podem levar à mutações, por meio de inserção de sequências gênicas alterando a expressão e ocasionando rearranjos cromossômicos. Sabe-se que estes elementos estão presentes na maioria dos organismos já analisados. A utilização de ETs é importante para a análise da relação entre fenótipos e genótipos, sendo possível a construção de bibliotecas genômicas de transposons, isolamento de genes (etiquetagem gênica ou inativação gênica por elementos transponíveis), e outras aplicações. Assim, o objetivo nesta revisão é fornecer informações sobre os tipos e aplicação dos Elementos Transponíveis microbianos. A revisão bibliográfica foi realizada em banco de dados como o *Google Acadêmico*, *Pubmed*, *Science Direct*, *Portal Capes* e *Scielo* utilizando os descritores transposons, tagging, fungi e microbial.

PALAVRAS-CHAVE: Transposons, retrotransposons, clonagem gênica, etiquetagem gênica e microorganismos.

ABSTRACT

Transposable elements (ET) are dispersed DNA sequences in the genome, with characteristic to pass from one location to another. After 25 years of discovery of the ETs by Barbara McClintock was confirmed the existence of these elements with use of molecular techniques, where it was found that ET can lead to mutations through insertion of gene sequences by altering the expression and chromosomal rearrangements leading. It is known that these elements are present in most organisms already analyzed. The use of ET is important to analyze the relationship between genotypes and phenotypes, it is possible to construct genomic libraries of transposons, isolation of genes (gene tagging or gene inactivation by transposable ele-

ments), and other applications. The objective of this review is to provide information about the types and application of microbial Transposable Elements. A literature review was performed on the database as Google Scholar, PubMed, Science Direct, Capes Portal and Scielo using transposons descriptors, tagging, fungi and microbial.

KEYWORDS: Transposons, retrotransposons, gene cloning, gene tagging and microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

Os elementos transponíveis (ETs), ou seja, as sequências do DNA móveis, foram primeiramente descritos por Bárbara McClintock na década de 1940, denominando inicialmente os mesmos de “elementos controladores”¹. A pesquisadora McClintock, estudando sementes de milho (*Zea mays*), verificou um padrão incomum na expressão e segregação dos genótipos que caracterizavam as colorações dos grãos, sugerindo portanto que no genoma estavam presentes “partículas móveis”, que alteravam os fenótipos da espécie, em relação à coloração destes grãos durante o cruzamento, envolvendo a família Ac-Ds de ETs^{2,3}. Até 1960 era considerado que somente o milho possuía as “partículas móveis”, pelo fato de ser uma cultura domesticada pelo homem. Posteriormente foram isolados os primeiros ETs do genoma de *E.coli*, sendo em seguida isolados de vários outros organismos⁴. Atualmente sabe-se que estes elementos estão distribuídos nos genomas de *Archaea*, Bactéria e Eukarya, e que há variação de uma espécie para outra em relação ao número de cópias, na distribuição e nos tipos de ETs existentes^{5,6}.

Elementos genéticos transponíveis podem ser definidos como sequências de DNA moderadamente repetitivas, que se encontram dispersos no genoma. As cópias ativas desses elementos se movem de um local para ou-

tro, codificando a enzima transposase. Esta enzima tem a função de catalisar a inserção de uma cópia idêntica do elemento em um novo sítio genômico, sendo este processo conhecido como transposição. Em geral, o processo de transposição apresenta baixa especificidade quanto ao sítio de inserção^{7,8,9,10}.

Considerando as espécies eucarióticas, existe uma grande diferença quanto à proporção dos ETs em cada genoma. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, esses elementos correspondem a 15%¹¹, enquanto que em levedura *Saccharomyces cerevisiae* os ETs estão presentes em 3,1%¹².

Codificando-se as diversas informações dos ETs, quanto a tamanho, estrutura e mecanismo de transposição, organizou-se um modelo unificado, constituído por grupos de elementos transponíveis que compartilham aspectos comuns de organização genética. Os ETs são divididos em duas classes, levando em consideração a presença ou ausência do intermediário RNA, durante a transposição^{9,13}: Classe I e Classe II.

A Classe I ou retrotransposons, é constituída pelos elementos que possuem o RNA como intermediário. Nesse caso, existe a transposição via RNA, que é transcrito a partir de uma cópia genômica e síntese de DNA complementar (cDNA), por meio da transcriptase reversa. Essa classe inclui os retrotransposons com LTRs (longas repetições terminais) e os retrotransposons sem LTRs, que são conhecidos como LINEs e SINEs.

A Classe II ou transposons de DNA é constituída pelos elementos que não possuem o intermediário de RNA, ou seja, a transposição ocorre DNA-DNA. A classe II é subdividida em 1 e 2: A subclasse 1 corresponde aos elementos que não se duplicam antes da inserção e se transpõem por mecanismos de excisão e integração; a subclasse 2 possui elementos que se duplicam antes da inserção^{14,15}.

A transposição dos elementos móveis de DNA pode ocorrer de forma autônoma, onde os elementos produzem suas próprias enzimas que auxiliam na mobilização, ou também pode ser não-autônoma. Neste último caso, a transposição depende das enzimas produzidas pelos elementos autônomos. Os elementos não autônomos, estão sujeitos a mutações que levam a um aumento da frequência de aparecimento de elementos transponíveis mobilizáveis incompletos^{1,2}.

Os ETs tem uma natureza “egoística” (os genes egoístas), de multiplicação dos mesmos ao longo do genoma. Este processo é um dos responsáveis pela ocorrência de variabilidade genética nas espécies, com a ocorrência de mutações em genes estruturais ou sequências regulatórias¹⁶.

A habilidade dos ETs de inserção aleatória em diferentes locais do genoma abriu caminho para uma nova aplicação dos mesmos, na manipulação genética *in vitro* dos organismos, tanto em eucariotos como em procario-

tos, visando o mapeamento genético, a clonagem de genes (identificação ou etiquetagem gênica) e a criação de transgênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo constitui-se de uma revisão da literatura especializada, no qual se realizou consultas nas plataformas de busca *Google Acadêmico*, *Pubmed*, *Science Direct*, *Portal Capes*, *SciELO* e *Web of Science*. A seleção dos artigos na pesquisa envolveu critérios como: artigos, dissertações, teses e livros em língua portuguesa e inglesa, disponíveis em texto completo, que se enquadravam no tema discutido e nos descritores: transposons, tagging, fungal, microbial. Foi desenvolvida uma pesquisa exploratória qualitativa por meio de leitura sistemática e seleção de informações obtidas de acordo com tema e objetivos da pesquisa.

3. DESENVOLVIMENTO

Elementos transponíveis

Os ETs são sequências de DNA dispersos no genoma, que tem característica de se transpor de um local para outro, de forma pouco específica no sítio em que foi inserido. Esses elementos possuem uma classificação em que são divididos em duas classes, baseando-se na presença ou ausência de RNA, como intermediário na transposição^{8,10}.

Após 25 anos da descoberta dos ETs, houve a confirmação da existência desses elementos com o uso da clonagem molecular³ e métodos moleculares, em que diferentes experimentos confirmaram a presença de elementos de DNA móveis, em organismos como bactérias, fungos, plantas e animais^{5,17,18}. Os ETs, nos genomas, encontram-se de forma variável, servindo como estruturas genéticas válidas para a comparação de genomas, entre as espécies¹⁵.

Com a transposição das sequências de DNA no genoma, há a ocorrência de novas mutações, sejam elas do tipo “sense” ou “non-sense”, de ponto ou mesmo com a ocorrência de rearranjos cromossômicos¹⁹, resultando na variabilidade genética, intra e inter específica. As alterações genéticas podem afetar a regulação gênica, que é um evento extremamente importante do ponto de vista evolutivo, com a formação de novos genes e/ou inativação de outros, podendo resultar em novos fenótipos, selecionáveis pela seleção natural, resultando em novas frequências de indivíduos na população¹⁹. Ainda, do ponto de vista evolutivo, deve-se destacar a possibilidade de transferência horizontal de genes, entre espécies diferentes, como observado, em experimento *in vitro*, no caso do gênero de fungo filamentosos *Fusarium* sp.²⁰.

Classificação dos elementos transponíveis

Desde os estudos iniciais dos ETs, sabe-se que esses estão presentes na maioria dos organismos já analisados, na qual compõem a maior parte das sequências repetitivas dos genomas. Atualmente existem diferentes tipos de ETs, e esses possuem níveis de classificação, bem como, classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília, de acordo com as características de estrutura e mecanismos de transposição comuns¹³.

Em relação à classe, os ETs são subdivididos em duas classes, com base no mecanismo de transposição do elemento: classe I e classe II (Tabela 1)^{21, 22, 23, 24, 25}.

Como exemplo de retrotransposons (Classe I) em fungos, pode ser citado o *Ty3/gypsy*, com genes de protease, transcriptase reversa, RNase e integrase, como os de *Fusarium oxysporum* (Elementos *Forete Skippy*), além de outros encontrados, por exemplo, em *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus nidulans*²³.

Os transposons são sequências de nucleotídeos, que possuem Repetições Terminais Invertidas (ITRs), que variam de 10 a 500 pb, que se movimentam pelo DNA por meio de clivagem do sítio original e sua inserção em outro sítio no genoma. As ITRs flanqueiam a região que codifica a enzima transposase, necessária nos eventos de transposição desta classe²⁴. Esta classe de elementos transponíveis nunca utiliza um intermediário de RNA para sua movimentação, eles conseguem sair de uma região e se inserirem em outra sem a participação de coadjuvantes²⁵.

Tabela 1. Características das duas maiores classes de ETs.

Elementos Transponíveis	Estrutura	Genes codificados	Transposição	Exemplos
Classe I	Longos, Repetições terminais diretas; Curtas repetições diretas flanqueando a uma sequência alvo.	Gene para Transcriptase Reversa (e eventualmente outros).	Via intermediária de RNA.	<i>Ty</i> (levedura); <i>Copia</i> (<i>Drosophila</i>); <i>Alu</i> (Humanos).
Classe II	Curtos, repetições terminais invertidas; Curtas repetições invertidas que flanqueiam uma sequência alvo.	Gene para Transposase (e eventualmente outros).	Através do DNA (replicativo ou não-replicativo).	<i>IS 1</i> (<i>E.coli</i>); <i>Tn3</i> (<i>E.coli</i>); <i>Ac, Ds</i> (milho); Elementos <i>P</i> (<i>Drosophila</i>).

Fonte: Adaptado de Pierce, 2008²⁷.

A especificidade do mecanismo de transposição da classe II, levando à classificação nas duas subclasses, pode ser assim delimitada: Na subclasse 1, o DNA não se duplica antes de sua inserção no genoma, ocorrendo o processo de transposição mediado pela DNA transposase,

por excisão e integração do mesmo. Na subclasse 2, ocorre a duplicação do DNA antes de ocorrer a inserção, por meio da clivagem de apenas uma das fitas do DNA, com conseqüente replicação de uma única fita²¹.

As duas classes são ainda divididas em superfamílias, que se caracterizam pela existência de domínios e assinaturas similares, sendo considerado as estruturas, organização, tamanho da inserção e a similaridade da sequência à nível de DNA e proteína. Na classe II algumas superfamílias são destacadas, como *Tc1-Mariner*, *hAt*, *Mutator* e *MITEs*, onde a *Tc1-Mariner* é amplamente encontrada em plantas, fungos e animais^{17,21}. Pereira, *et al.* (2013)²⁶, isolaram um transposon pertencente à nova superfamília da classe II, conhecida como *PIF/Harbinger*. Este transposon, denominado *Boto*, foi detectado pela primeira vez no genoma de um fungo fitopatogênico (*Moniliophthora perniciosa*).

Clonagem gênica baseada em elementos transponíveis

A utilização de elementos transponíveis vem sendo cada vez mais usada em pesquisas nas mais diversas áreas. Têm sido muito importante, por exemplo, para a análise da relação entre os fenótipos e genótipos, uma vez que o sequenciamento desses elementos genéticos móveis possibilitaria o monitoramento da ação de diferentes ambientes sobre o gene (atividade de transposição). Além disso, pesquisas mostrando as diferenças entre linhagens de microrganismos são possíveis, possibilitando os estudos de evolução das linhagens e sua adaptação ao meio²⁸.

Outra área que possui bastante evidência na pesquisa de transposons é a geração de mutantes randômicos. De acordo com Jiang *et al.* (2013)²⁹, os elementos transponíveis são diversos e estão presentes na maioria dos grupos de Ascomicetos, Zigomicetos e Basidiomicetos, sendo detectados na maioria das linhagens naturais. Os ETs podem ser usados como um método altamente eficiente para a descoberta de novos genes e para a identificação da função gênica via mutagenese com alta taxa de transferência em fungos filamentosos. Esta técnica pode ser denominada como Inativação Gênica mediada por Transposon (IGT) – Transposon arrayed gene knockout (TKO ou TAGKO) ou Etiquetagem Gênica mediada por Transposons (EGT). Ela foi inicialmente desenvolvida em *Magnaporthe grisea* e *M. graminicola*, por Hamer *et al.* (2001)³⁰, com o objetivo de investigar a via de oxidação dos aminoácidos. Esta técnica tem sido largamente empregada (Tabela 2).

O uso de novas construções de plasmídeos contendo genes de interesse, levou ao emprego de elementos transponíveis como novas ferramentas de manipulação genética. O mini transposon UIB possui um sistema estável e que não necessita de plasmídeos auxiliares.

Tabela 2. Exemplos de bibliotecas de mutantes randômicos em fungos filamentosos usando elementos transponíveis.

Espécies & Referências	Características do Sistema	Principais resultados
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> ³¹ .	Elemento Transponível: <i>Impala</i> , Protoplasto/PEG	A reinserção do transposon <i>impala</i> foi observada em mais de 70% dos casos. Pela análise de 746 revertentes nas plantas, uma alta proporção (3,5%) de mutantes com patogenicidade reduzida foram recuperadas.
<i>Mycosphaerella graminicola</i> ³²	Elemento Transponível: <i>Sif</i> EcoRI – linearizada pCB1003, Protoplasto/eletroporação	Conjunto de cosmídios de 250 clones mutagenizados, 5.110 eventos de inserção única, 10 clones produziram mutantes gênicos específicos com uma frequência alvo de 15-28%.
<i>Aspergillus fumigatus</i> ³³	Elemento Transponível: <i>Impala160</i> , Conidíod/eletroporação	2.386 mutantes, 1,2% com uma cópia do elemento transponível em <i>locus</i> essencial para o crescimento, descrevendo 20 genes não caracterizados em <i>A. fumigatus</i> .
<i>Fusarium oxysporum</i> ³⁴	Elemento Transponível: <i>MITEs: mimp1</i> Protoplasto/PEG	Mostrou que <i>mimp1</i> re-insere com alta frequência em regiões gênicas em <i>F. oxysporum</i> . Comprovou-se ainda que o sistema composto por dois transposons <i>mimp1/impala</i> é completamente funcional na espécie heteróloga <i>F. graminearum</i> permitindo o desenvolvimento de uma ferramenta com alta eficiência para etiquetagem gênica.
<i>Fusarium graminearum</i> ³⁵	Elemento Transponível: <i>MITEs: mimp1</i> Protoplasto/PEG	Seleção de 331 mutantes para desenvolvimento sexual, crescimento radial e patogenicidade em trigo, resultou em 19 mutantes (5,7%) com fenótipos alterados.
<i>Fusarium oxysporum</i> ³⁶	Elemento Transponível: <i>Imp160:gfp</i> , Protoplasto	2.072 transformantes, 7 linhagens com virulência reduzida, 75% de 12 revertentes com inserção única, isolamento do novo gene de virulência <i>FOXG 00016</i> .
<i>Aspergillus niger</i> ³⁷	Elemento Transponível: <i>Vader</i> , Protoplasto/PEG	1 transformante em 1,2x10 ⁵ conidióforos, 95 de 97 linhagens analisadas com <i>footprints</i> de elementos transponíveis, determinando os sítios de reintegração de 21 eventos de excisão independentes.

Fonte: Adaptado de Jiang, et al. (2013)²⁹

Este transposon insere um plasmídeo independente, que é muito ativo durante o processo de conjugação, tornando possível sua transmissão entre os microrganismos, destacando a possibilidade de utilização do mesmo na transformação gênica³⁸.

As aplicações práticas dos elementos transponíveis em marcação de genes e análise populacional é uma questão de grande importância, uma vez que facilitaria a pesquisa em biologia sistemática e funcional¹⁷. Holmes (2002)³⁹ destaca que um dos principais motivos do interesse voltado ao estudo dos elementos transponíveis são suas aplicações como ferramentas na pesquisa e na análise filogenética. Essas aplicações incluem a sua capacidade como vetores de transformação e como eficientes marcadores de genes.

Em estudos de mutação insercional, os transposons tem a vantagem de servirem como etiquetas do gene mutado, facilitando a sua clonagem. Alguns ETs podem ser modificados para serem usados como ferramentas em estudos moleculares, como no caso do elemento *Ac*, modificado para ser transposto somente quando induzido e apenas uma vez. O elemento *Ac/Ds*, encontrado em milho, possui uma característica interessante para essa aplicação, onde ele tem a capacidade de transpor em espécies distintas, e até mesmo em reinos distintos, como em *S. cerevisiae*⁴⁰.

Assim, o isolamento ou a detecção de genes de interesse biotecnológico via IGT, perpassa pela utilização de inúmeras técnicas (Figura 1): 1) A escolha do método de transformação genética do microrganismo-hospedeiro com o método químico baseado no uso de protoplastos e PEG/CaCl₂; ou uso de biolística; ou uso de *Agrobacterium*; ou eletroporação, entre outros. 2) desenho e preparo do cassete ou vetor de transformação, podendo ser constituído/combinado de a) um sistema duplo formado por um vetor contendo o marcador de seleção (higromicina, fluorescência, etc.) e outro vetor com o transposon ativo; b) um sistema duplo formado por um vetor contendo o marcador de seleção e com um elemento de transposição inativo mas mobilizável e outro vetor contendo o gene associado à transposição (transposase ou transcriptase reversa); c) um sistema único constituído por vetor/cassete contendo genes de seleção e elemento transponível ativo; 3) A seleção dos transformantes, de acordo com os sistemas de transformação genética empregados; 4) análise molecular dos transformantes para verificar o tipo de integração do vetor ou vetores, no genoma do microrganismo hospedeiro; 5) Seleção dos transformantes com fenótipos mutantes quanto à característica de interesse (fitopatogenicidade, resistência a antibióticos, entre outros) e 6) Análises complementares dos mutantes insercionais por IGT, empregando diversas tecnologias (microarray, transcriptoma, proteoma, metaboloma, entre outros).

Além dos fungos, pode-se aplicar também a técnica

IGT para o estudo de genes bacterianos. O uso de mini-transposons para este fim se mostrou muito eficiente na maioria das bactérias testadas, falhando, contudo, na geração dos mutantes nos gêneros *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Photobacterium*, e *Promicromonospora*³⁸. O transposon *Himar1* se mostrou muito eficiente na geração de mutantes em bactérias, além de mostrar sua importância na identificação e clonagem do transposon após sua inserção no microrganismo⁴¹.

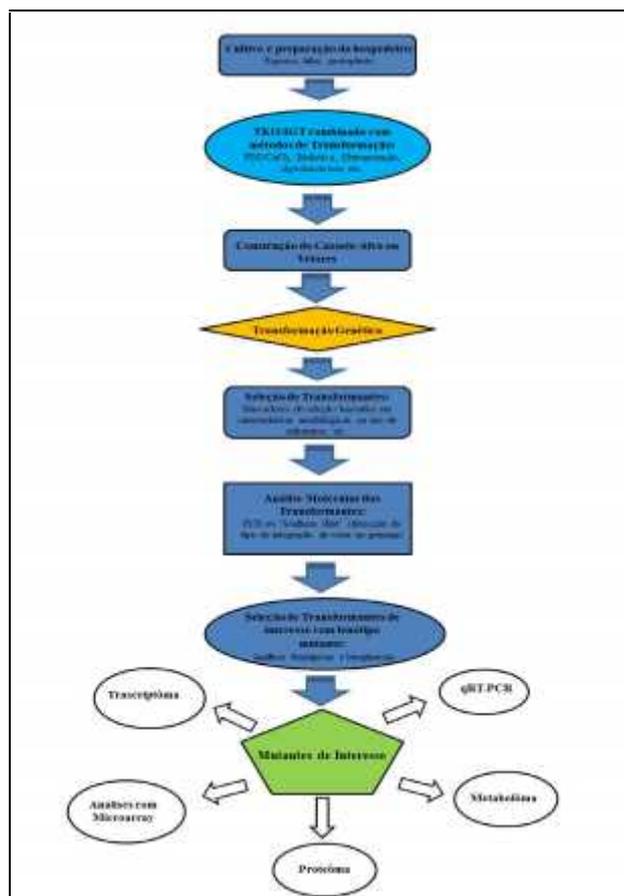


Figura 1. Fluxograma da metodologia geral de inativação gênica baseada em transposon (Adaptado de Jiang *et al.* (2013)²⁹)

4. CONCLUSÃO

Como já mencionado, os Elementos Transponíveis (ETs) são importantes para a análise da relação entre fenótipos e genótipos, baseado em metodologias em que são obtidas bibliotecas genômicas de transposons. Pesquisas demonstram diferenças entre linhagens de microrganismos, possibilitando os estudos de evolução das linhagens e sua adaptação ao meio²⁸.

Os Elementos transponíveis, sejam eles transposons ou retrotransposons, têm sido empregados com sucesso para o estudo da função gênica em eucariotos e procaríotos, resultando na detecção e na clonagem de genes

importantes para diversas funções biológicas como àquelas associadas a interação entre microrganismos e plantas hospedeiras, como genes associados à virulência e/ou patogenicidade.

Técnicas de biologia molecular tiveram um desenvolvimento importante na última década com a construção de novas ferramentas de inativação gênica (*knockout* gênico) desenvolvidas a partir de vetores baseados em elementos transponíveis. Essas ferramentas associadas a métodos efetivos de transformação genética microbiana abrem uma nova frente de estudo e manipulação gênica em microrganismos de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- [1] Kidwell MG, Lisch DR. Perspective: Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution*. 2001; 55(1):1-24.
- [2] Capy P, Anxolabéhère D, Langin T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends Genet*. 1994; 10(1):7-12.
- [3] Jones RN. McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenet Genome Res*. 2005; 109(1-3):90-103.
- [4] Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Introdução à Análise Genética*, 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- [5] Daboussi MJ. Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetics*. 1997; 100:253-60.
- [6] Kidwell MG, Lisch DR. Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol*. 2000; 15(3):95-9.
- [7] Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. *Biologia molecular básica*. 3ªed. Porto Alegre: Mercado Aberto. 2003; 421.
- [8] Kidwell MG. Transposable elements. In: Gregory, TR (org.). *The evolution of the Genome*, New York: Elsevier Academic Press. 2005; 3:165-221.
- [9] Almeida APMM. Caracterização do elemento transponível Boto em *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vas-soura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*). [dissertação] Minas Gerais: Universidade Estadual de Viçosa; 2009.
- [10] Braga RM. Identificação de caracterização de elementos transponíveis da classe II em *Colletotrichum graminicola*. [dissertação] Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa. 2012.
- [11] Pimpinelli S, Berloco M, Fantit L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, *et al.* Transposable elements are structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:3804-8.
- [12] Goffeau A, Barrell Bg, Bussey H, Davis Rw, Dujon B, Feldmann H, *et al.* Life with 6000 genes. *Science*. 1996; 274:562-7.
- [13] Watson JD, *et al.* Site-Specific Recombination and transposition of DNA in: *Molecular biology of the gene*. San Francisco: Benjamin Cummings. 2004; 11:293-342.
- [14] Finnegan DJ. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet*. 1989; 5:103-7.
- [15] Wright SI, Finnegan D. Genome evolution: Sex and the transposable element. *Current Biology*. 2001; 11:296-299.

- [16]Kidwell MG, Lisch DR. Transposable elements as source of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(15):7704-11.
- [17]Daboussi MJ, Capy P. Transposable elements in filamentous fungi. *Ann Rev Microbiol*. 2003; 57:275-99.
- [18]Biemont C; Vieira C. Genetics – Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 2006; 443(7111):521-4.
- [19]Oliver KR, Greene WK. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays*. 2009; 31(7):703-14.
- [20]Hua-Van A, Pamphile JA, Langin T, Daboussi MJ. Transposition of autonomous engineered impala transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Mol Gen Genet*. 2001; 264(5):724-31.
- [21]Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhou B, *et al.* A unified classifications system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(12):973-82.
- [22]Sabot F, Schulman AH. Genomics of transposable elements in the Triticeae. In: Muehlbauer GJ, Feuillet C, editors. *Genetics and genomics of the Triticeae*. New York: Springer-Verlag. 2009; 387-05.
- [23]Azevedo JL. *Genética de Microrganismos*. 2ªed. Goiânia: UFG, 2008.
- [24]Cordeiro J. Investigação sobre a presença de retrotransposons em populações naturais do grupo Cardini do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) do sul do Brasil. [dissertação] Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2005.
- [25]Pray LA. Transposons: The jumping genes. *Nature Education*. 2008; 1(1):204.
- [26]Pereira JF, Almeida APMM, Cota J, Pamphile JA, Silva GF, Araújo EF, *et al.* *Microbiology*. 2013; 159:112-25.
- [27]Pierce, BA. *Genética – Um enfoque conceitual*. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.
- [28]Opijnen TV, Camilli A. Transposon Insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11:435-42.
- [29]Jiang D, Zhu W, Wang Y, Sun C, Zhang K, Yang J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv*. 2013; 31:1562-74.
- [30]Hamer L, Adachi K, Montenegro-Chomorro MV, Tanzer MM, Mahanty SK, Lo C, *et al.* Gene Discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(9):5110-15.
- [31]Migheli Q, Steinberg C, Davière JM, Olivain C, Gerlinger C, Gautheron N, *et al.* Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of Impala in *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Phytopathology*. 2000; 90(11):1279-84.
- [32]Adachi K, Nelson GH, Peoples KA, Frank AS, Montenegro-Chomorro MV, Zwaan TM, *et al.* Efficient gene identification and targeted gene disruption in the wheat blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* using TAGKO. *Curr Genet*. 2002; 42:123-27.
- [33]Firon A, Villalba F, Beffa R, D'Enfert C. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. *Eukaryot Cell*. 2003; 2:247-55.
- [34]Dufresne M, Hua-Van A, El Wahab HA, Ben M'Barek S, Vasnier C, Teyssset L, *et al.* Transposition of a fungal miniature inverted-repeat transposable element through the action of a Tc1-like transposase. *Genetics*. 2007; 175:441-52.
- [35]Dufresne M, Lee TVD, M'Barek SB, Xu X, Zhang X, Liu T, *et al.* Erratum to “Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*”. *Fungal Genet Biol*. 2008; 45: 1552–61.
- [36]Lopes-Berges MS, Pietro AD, Daboussi MJ, Wahab HA, Vasnier C, Roncero MI, *et al.* Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Mol Plant Pathol*. 2009; 10:95-107.
- [37]Hihlal E, Braumann I, Berg VD, Kempken F. Suitability of *Vader* for Transposon-Mediated Mutagenesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(7):2332-6.
- [38]Christie-Oleza Ja, Brunet-Galmés, Lalucat J, Nogales B, Bosch R. MiniUIB, A Novel Minitransposon-Based System for Stable Insertion of Foreign DNA into the Genomes of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79:1628-38.
- [39]Holmes I. Transcendent elements: whole-genome transposon screens and open evolutionary questions. *Genome Res*. 2002; 12(8):1152-5.
- [40]Weil CF, Kunze R. Transpositions of maize *Ac/Ds* transposable elements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genetics*. 2000; 25:187-90.
- [41]Bilyk B, Weber S, Myronovski M, Bilyk O, Petzke L, Lutzetsky A. *In vivo* random mutagenesis of streptomycetes using mariner-based transposon *Himar1*. *App Environ Biotechnol*. 2013; 97:351-9.

