**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**MATHEUS LOPES BRAGA**

# *“SISTEMAS DE TRANSFORMAÇÃO EM Beauveria bassiana”*

Porto Alegre

Setembro de 2025

MATHEUS LOPES BRAGA

# *“SISTEMAS DE TRANSFORMAÇÃO EM Beauveria bassiana”*

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre

Setembro de 2025

CIP - Catalogação na Publicação

Braga, Matheus Lopes
Sistemas de transformação em Beauveria bassiana / Matheus Lopes Braga. -- 2025.
103 f.
Orientador: Charley Christian Staats.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2025.

1. Fungo filamentoso. 2. Beauveria bassiana. 3. Transformação. 4. niaD. 5. SUR1. I. Staats, Charley Christian, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular e Celular, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

‘’A imaginação é mais importante que o conhecimento, porque o conhecimento é limitado, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Charley Christian Staats, pela oportunidade de fazer parte deste grupo, pelas inúmeras trocas de conhecimento e por todo apoio ao longo da elaboração da minha dissertação.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, especialmente minha mãe, Saionara, e minha irmã, Dayane, pelo apoio, presença e incentivo para que eu fosse cada vez mais longe.

À minha namorada, Eduarda, que tem sido uma grande companheira desde sempre, por ser meu ponto de equilíbrio e por estar ao meu lado, apoiando, ajudando e incentivando-me durante todo o período do mestrado, oferecendo carinho, paciência e compreensão, tornando os momentos difíceis mais leves e celebrando comigo cada conquista ao longo desta jornada.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular e Celular (219); à Maria Eduarda, por todas as trocas de conhecimento e por sempre dispor de um tempo para me ajudar com dúvidas; ao pós-doutorando Henrique Antoniolli, por toda ajuda em bioinformática e por sempre se disponibilizar a me auxiliar; à mestranda Deisiane, pelas trocas de conhecimento em experimentos; à doutoranda Mauren, por toda troca de conhecimento; e à doutoranda Alexandra, por toda a sua ajuda.

A todos que não mencionei, mas que fizeram parte da minha trajetória, deixo meu sincero agradecimento, pois certamente tiveram um papel importante nesta etapa da minha vida e contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

**SUMÁRIO**

**LISTA DE ABREVIAÇÕES**.....7
**LISTA DE FIGURAS**.....8
**LISTA DE TABELAS**.....9
**RESUMO**.....10
**ABSTRACT**.....11
**1. INTRODUÇÃO**.....12
**1.1.Contextualização**.....12
**1.2. O fungo *Beauveria bassiana***.....15
**1.3. Estratégias de transformação para o fungo *B. bassiana***.....19
**1.3.1 Marcas de seleção dominantes no fungo *B. bassiana***.....21
**1.3.2 Marcas de seleção auxotróficas no fungo *B. bassiana***.....23
**1.4 Utilização de transformação por métodos de co-seleção em fungos filamentosos**.....24
**1.5. O gene *niaD* como alvo de co-seleção**.....25
**1.6 Elementos de transposição em fungos filamentosos**.....27
**2. Objetivo Geral**.....30
**2.1 Objetivos específicos**.....30
**3. RESULTADOS**.....31
**CAPÍTULO I**.....32
**3.1 MATERIAIS E MÉTODOS CAPÍTULO I**.....32
**3.1.1. Linhagens e condições de cultivo**.....32
**3.1.2. Avaliação do perfil de susceptibilidade de *B. bassiana* a diferentes agentes de seleção**.....32
**3.1.3. Construção vetorial**.....32
**3.1.4. Preparação de blastosporos**.....33
**3.1.5. Eletroporação**.....34
**3.1.6. Exame da estabilidade mitótica**.....34
**3.1.7. Extração de DNAs genômicos**.....34
**3.1.8. Análise de PCR**.....35
**3.2. RESULTADOS 3.2.1 Desenvolvimento de um sistema de transformação baseado na marca de seleção *SUR1***.....36
**3.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS**.....37
**CAPÍTULO II**.....44
**4.DISCUSSÃO GERAL**.....88
**5. CONCLUSÕES**.....91
**6. PERSPECTIVAS**.....92
**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....93
**8. CURRICULUM VITAE**.....101

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

° C - Celsius

h - Horas

KV - Kilovolt

mL - Mililitro

ms - Milisegundos

µL - Microlitro

*argB* – Gene envolvido na biossíntese de arginina

*B. bassiana – Beauveria bassiana*

CIM - Concentração inibitória mínima

CRISPR-Cas9 – Técnica de edição gênica baseada em sistema imune bacteriano (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* / *CRISPR-associated protein 9*)

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ETs – Elementos Transponíveis

*hisB* – Gene envolvido na biossíntese de histidina

ITS – Região do DNA, *ribosomal Internal Transcribed Spacer*

*LINEs – Long Interspersed Nuclear Elements*

LTR – *Long Terminal Repeat*

MIP – Manejo Integrado de Pragas

*niaD* – Gene codificador da nitrato redutase

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

*pyrG* – Gene da orotidina-5′-fosfato descarboxilase (biossíntese de uridina)

RNAi– *RNA interference* (Interferência por RNA)

RPM - Rotação por minuto

*SINEs – Short Interspersed Nuclear Elements*

*TIR – Terminal Inverted Repeat*

TEF-1α - *Translation Elongation Factor 1-alpha* (Fator de Elongação de Translação 1-alfa)

UV – Radiação ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uso de agrotóxicos no ano de 2022 no mundo, medido em toneladas de consumo anual..... 15
Figura 2: Número de produtos registrados no Brasil derivados de diferentes microrganismos usados no controle biológico de pragas agrícolas..... 17
Figura 3: Ciclo de infecção de fungos entomopatogênicos..... 19
Figura 4: Mecanismos de Ação de Compostos…….23
Figura 5: Classificação de elementos transponíveis eucarióticos..... 29
Figura 6: Mapa genético do plasmídeo pPZP201BK–Sur (9668 pb).....33
Figura 7:Teste de sensibilidade de *B. bassiana* AS272 a higromicina e nourseotricina..... 37
Figura 8: Teste de sensibilidade de *B. bassiana* AS272 ao clorimuron-etil..... 38
Figura 9: Crescimento de transformantes de *B. bassiana* em clorimuron-etil.... 39
Figura 10: Crescimento de colônias após transformação com diferentes concentrações de amplicon..... 40
Figura 11: Distribuição do número de colônias obtidas em diferentes concentrações de amplicon (1 µg, 2,5 µg e 5 µg).....41
Figura 12: Teste de sensibilidade de *Beauveria bassiana* ao clorimuron-etil..... 42
Figura 13: Análise de PCR do gene *SUR1* em *B. bassiana* AS272 selvagem e transformante..... 43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de primers usados na geração de produtos de PCR e nas análises de confirmação da transformação..... 35

**RESUMO**

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é considerado um organismo modelo para estudos de engenharia genética e amplamente utilizado como agente de controle biológico. No entanto, a eficiência das técnicas de transformação genética ainda é limitante. Este trabalho emprega duas abordagens complementares para avançar no estudo deste fungo. A primeira abordagem consistiu no desenvolvimento de um sistema de transformação genética baseado na inserção do gene marcador *SUR*, que confere resistência ao herbicida clorimuron-etil. Foram avaliadas diferentes concentrações do agente seletivo, determinando-se a concentração inibitória mínima de 10 µg/mL para seleção de transformantes. A transformação por eletroporação mostrou eficácia dependente da quantidade de produto de PCR, com integração estável confirmada por análise molecular e manutenção da resistência em cultivos sucessivos. A segunda abordagem compreendeu a caracterização molecular do elemento transponível *hupfer* em *Cordycipitaceae*. Sua ocorrência mostrou-se restrita aos gêneros *Beauveria* e *Cordyceps*. Análises filogenéticas de sequências proteicas revelaram agrupamentos incongruentes com a filogenia dos hospedeiros, sugerindo transferência horizontal. Identificamos conservação do domínio catalítico e variabilidade em regiões não codificantes, indicando manutenção funcional com adaptações específicas. A análise de padrões de cobertura genômica detectou múltiplas cópias em regiões específicas, indicando hotspots de inserção e recombinação ativa. Estes resultados representam avanços na manipulação genética de *B. bassiana*, com o desenvolvimento de um sistema de transformação baseado no gene *SUR*, e fornece novos *insights* sobre a dinâmica evolutiva de transposons, destacando sua importância na diversidade genômica e aplicações biotecnológicas.

**ABSTRACT**

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is considered a model for genetic engineering studies, although the efficiency of techniques for genetic transformation is restricted, which limits the manipulation of genes of interest. Moreover, this fungus is widely used as a biological control for agricultural pests due to its ability to infect and kill a range of arthropod hosts. In this work, two complementary approaches were employed. The first approach was based on the genetic transformation of *B. bassiana* by the insertion of the *SUR1* marker, which confers resistance to chlorimuron-ethyl. With this, different concentrations of the selective agent chlorimuron-ethyl were evaluated; the minimum inhibitory concentration of 10 µg/mL was determined, capable of differentiating transformed cells from non-transformed cells. Electroporation transformation demonstrated an efficiency proportional to the PCR product, with a stable *SUR1* gene integration confirmed by PCR, as well as the maintenance of resistance to chlorimuron-ethyl in multiple cultivations. This data is essential for future genetic transformations in *B. bassiana*. The second approach involved the molecular characterization of the transposable element *hupfer* in species of the *Cordycipitaceae* family. The analyses demonstrated that it is limited to the genera *Beauveria* and *Cordyceps*. The phylogenetic analyses of the transposase conding gene or protein sequence? revealed that there are incongruent groupings with the phylogeny of the host species, suggesting events of horizontal transfer. The study revealed conservation of the catalytic domain and variability within non-coding regions, suggesting functional maintenance in relation to specific adaptations. Alongside patterns of genomic coverage, multiplicity suggests locations of insertions and active recombination. These results underscore the efforts to manipulate the genetic system in *B. bassiana*, and as this is a transformation system based on *SUR1*, give us new ways to consider novel and evolutionarily-relevant dynamics, the implications of transposons, genomic variation, biotechnologically-relevant behavior, and effects.

# 1. INTRODUÇÃO

*Beauveria bassiana* é um microrganismo utilizado como agente de controle biológico devido a sua importância agrícola (ZIMMERMANN, 2007). A geração, através de edição genômica, de linhagens deste fungo entomopatogênico com virulência aumentada é uma estratégia biotecnológica para otimizar sua eficácia. Essa estratégia depende de um marcador de seleção, cuja edição ou inativação confere resistência a um determinado agente de seleção ou droga, no qual permite a identificação de transformantes. Nesta dissertação, avaliou-se a susceptibilidade de *B. bassiana* a diferentes agentes de seleção associados a potenciais marcadores de seleção negativa. Os resultados revelaram diferenças relevantes na sensibilidade do fungo aos compostos testados, o que contribui para a seleção de marcadores adequados e representa um avanço nas pesquisas de aprimoramento genético de *B. bassiana*. A presente dissertação está organizada em Introdução, Revisão Bibliográfica, Metodologia, Discussão dos Resultados e Considerações Finais, destacando a importância do estudo para a área.

## 1.1. Contextualização

O filo dos artrópodes contém ácaros e insetos, e embora apenas uma pequena porcentagem desses insetos causem impacto na produção agrícola mundial e na segurança alimentar, eles são responsáveis por uma perda econômica de alto valor, alcançando cerca de US$70 bilhões anualmente para economia mundial devido a danos na agricultura (BRADSHAW et al., 2016). A agricultura é de suma importância para a economia mundial, e no Brasil não é diferente. O sucesso da agricultura comercial brasileira se deve a disponibilidade de muitas terras cultiváveis, tendo um clima que favorece o crescimento, políticas de incentivo, pesquisas de agências governamentais e universidades auxiliando no melhoramento de cultivares de interesse (OLIVEIRA et al., 2013). Assim como ocorre em todo o mundo, os insetos-praga acabam atacando a

agricultura brasileira. Estima-se que esses insetos sejam responsáveis por prejuízos de US$12 bilhões/ano à economia brasileira (OLIVEIRA et al., 2013).

Nas últimas décadas, os sistemas agrícolas convencionais têm dependido fortemente do uso de pesticidas químicos **(Figura 1)**, que são amplamente utilizados para o controle de pragas e para a proteção da produtividade das colheitas (LYKOGIANNI et al., 2021). O uso exagerado desses compostos químicos têm causado preocupações devido aos seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). A busca por desenvolvimento e registro de novos pesticidas cresce conforme o surgimento de pragas resistentes (BRAS et al., 2022). Assim, cresce o interesse em alternativas não químicas. A agricultura industrial utiliza inseticidas em excesso, muitos desses causando o ressurgimento de pragas de insetos devido a eliminação de presas naturais ou mesmo gerando populações mais resistentes (ALTIERI; NICHOLLS, 2018). Mais de 550 espécies de artrópodes adquiriram resistência a pelo menos um tipo de inseticida no mundo (WHALON et al., 2008). Diante desse contexto, as estratégias de controle biológico têm um papel fundamental em métodos sustentáveis de manejar pragas, reduzindo a dependência química, mas também mitigar o dano ambiental e a resistência a pesticidas.

Os agentes de controle biológico são uma alternativa para mitigar o uso indiscriminado de químicos agrícolas, fazer o controle de pragas, além de promover o crescimento das culturas. Os agentes biológicos têm uma estimativa de participação no mercado global de produtos biológicos agrícolas em torno de US$43,53 bilhões até 2035 (ROOTS ANALYSIS, 2023). O uso de microrganismos benéficos como controle de pragas cresce a cada ano, dentre eles os fungos entomopatogênicos como *Metarhizium spp.* (*Ascomycota: Clavicipitaceae*) e *Beauveria spp.* (*Ascomycota: Cordycipitaceae*) (MASCARIN et al., 2019). Mesmo tendo alto potencial para o controle biológico, existem desafios na eficácia de fungos entomopatogênicos devido à maior sensibilidade às condições ambientais (umidade, temperatura e radiação UV), pela ação mais lenta comparado aos agroquímicos, pela baixa estabilidade durante o

armazenamento e também pela alta dosagem necessária para controlar a praga (LOVETT; ST. LEGER, 2017).

Diante disso, o desenvolvimento de ferramentas genéticas para melhorar a manipulação de fungos entomopatogênicos mostra-se crucial para superar as atuais limitações e potencializar sua eficácia no controle biológico de pragas resistentes. Técnicas como fusão de protoplastos, edição gênica via *CRISPR-Cas9* e expressão de genes heterólogos auxiliam a introdução de particularidades mais precisas e controladas (MASCARIN et al., 2024). Além de utilização no controle de pragas agrícolas, fungos geneticamente modificados também são estudados em outras áreas da biotecnologia como a biorremediação. A flexibilidade desses microrganismos, combinada com avanços de técnicas de manipulação genética, abre caminho para ideias inovadoras em gestão ambiental e agricultura.

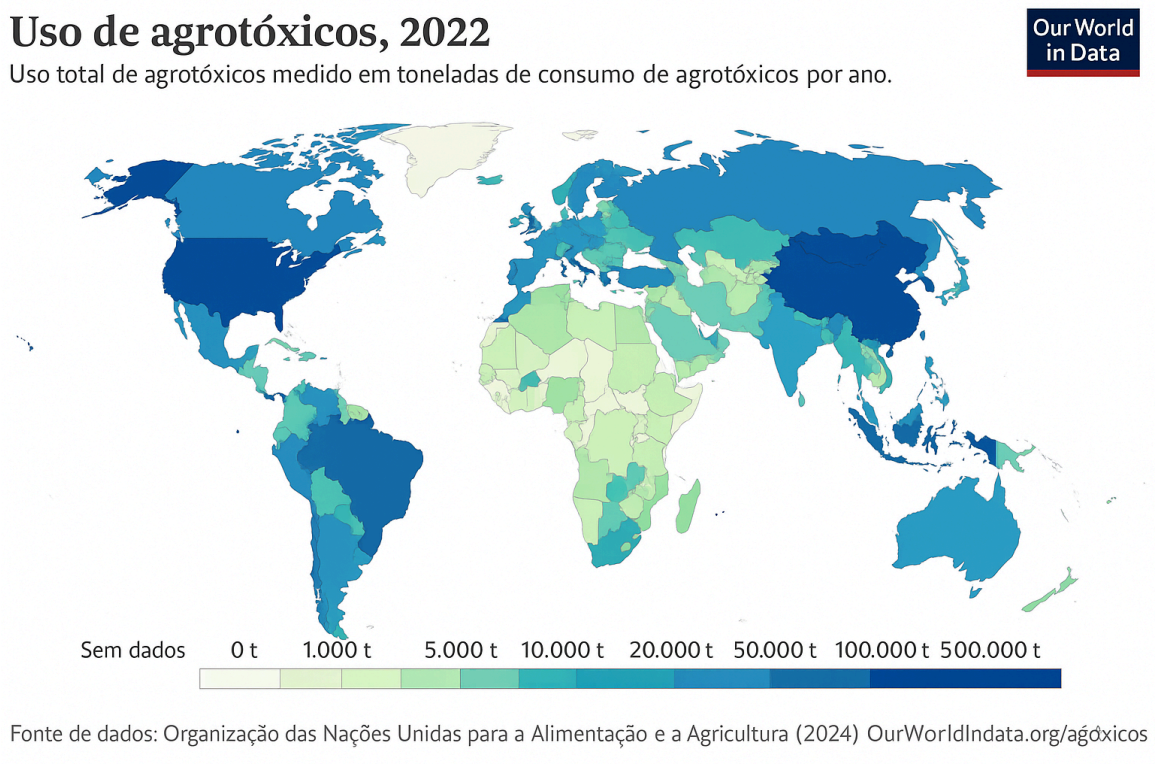



**Figura 1: Uso de agrotóxicos no ano de 2022 no mundo,** medido em toneladas de consumo anual. Adaptado de OurWorld Data, 2024

### 1.2. O fungo Beauveria bassiana

*B. bassiana* é um fungo entomopatogênico que é normalmente utilizado como controle biológico de pragas agrícolas, pois tem a capacidade de infectar e matar insetos (ZIMMERMANN, 2007). *B. bassiana* pertence ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales* e família *Cordycipitaceae* (REHNER et al., 2011). Apresenta virulência contra uma grande diversidade de hospedeiros, em especial insetos-praga, o que é uma alternativa sustentável ao uso de inseticidas químicos (Lacey et al., 2015). A identificação taxonômica de *B. bassiana* é de fundamental importância para diferenciá-lo de outros fungos entomopatogênicos, como por exemplo o *Metarhizium anisopliae*. Estudos moleculares, uma abordagem multigenética, complementando o ITS com a análise de genes como TEF-1α (Fator de Elongação de Translação 1-alfa), RPB1 (RNA Polimerase II) e RPB2, são frequentemente utilizados para

confirmar sua classificação, além de análises bioquímicas e proteômicas (REHNER & BUCKLEY, 2005).

Os fungos entomopatogênicos apresentam grandes desafios para conseguir infectar os hospedeiros e produzir esporos infecciosos suficientes para manter populações em níveis adequados. A transmissão ocorre por contato direto entre os cadáveres infectados e hospedeiros ou através de esporos transportados pelo ar. Os esporos ao germinarem produzem enzimas, entre elas proteases, lipases e quitinases, que ocasionam a degradação da camada de quitina. Concomitantemente, o tubo germinativo frequentemente se diferencia em uma estrutura de infecção especializada, o apressório, que se adere firmemente à cutícula e gera pressão mecânica,que permite a penetração do fungo no hospedeiro (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI, 2013). Já as células fúngicas precisam crescer dentro da hemocele ou em outros tecidos do corpo do hospedeiro, onde se multiplicam na forma de blastósporos, utilizando os nutrientes presentes no inseto e liberando toxinas, como a beauvericina, que são tóxicas para o hospedeiro provocando sua morte (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Por fim, o fungo patógeno precisa de um domínio ecológico sobre o cadáver do hospedeiro para que assim a produção otimizada e a dispersão de esporos predominem sobre as condições ambientais (VEGA et al., 2012).

No meio ambiente, *B. bassiana* é um importante agente no controle de pragas agrícolas. Serve tanto para surtos de insetos e mantendo o equilíbrio no ambiente (LACEY et al., 2015). Esses hospedeiros permitem que atue como agente supressor de populações, que quando estão em condições favoráveis podem se tornar pragas, causando um dano significativo na produção agrícola. Esse papel regulador é de fundamental importância em *habitats* onde há predadores naturais não tão eficazes, seja pela ausência ou por alterações ambientais provocadas pela ação humana (VEGA et al., 2009). *B. bassiana* interage com outros microrganismos entomopatogênicos, auxiliando na regulação das populações de insetos. *B. bassiana* não tem apenas a função como um agente de controle biológico, mas também tem interações complexas com o ambiente, sendo um componente importante na manutenção da homeostase ecológica (MEYLING; EILIENBERG, 2007).

*B. bassiana* é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados na agricultura como controle biológico de pragas agrícolas. Sua eficácia a torna uma ferramenta essencial no Manejo Integrado de Pragas (MIP), estratégia que auxilia na redução da dependência de agrotóxicos, causando menos danos na saúde humana e ambiental (LACEY et al., 2015). Por exemplo, o gorgulho aquático do arroz (*Oryzophagus oryzae*) é responsável por diminuir a produção de arroz no estado em até 10% (OLIVEIRA et al., 2013). Outro efeito negativo da presença de insetos-pragas se dá pelo uso excessivo de inseticidas. Diante disso, o uso de *B. bassiana* como bioinseticida apresenta muitas vantagens. A sua ação é provocada por uma infecção e proliferação no corpo do inseto, não dependendo de ingestão, o que facilita a sua aplicação em pragas de difícil manejo(MEYLING; EILIENBERG, 2007). O comércio de *B. bassiana* como bioinseticida tem muitas formulações **(Figura 2)**, como em grânulos, suspensões concentradas e pó molhável que são adaptadas para serem utilizadas em diferentes condições de cultivo como o tipo de cultura (solo ou folhagem) e ambientais (JARONSKI, 2009).

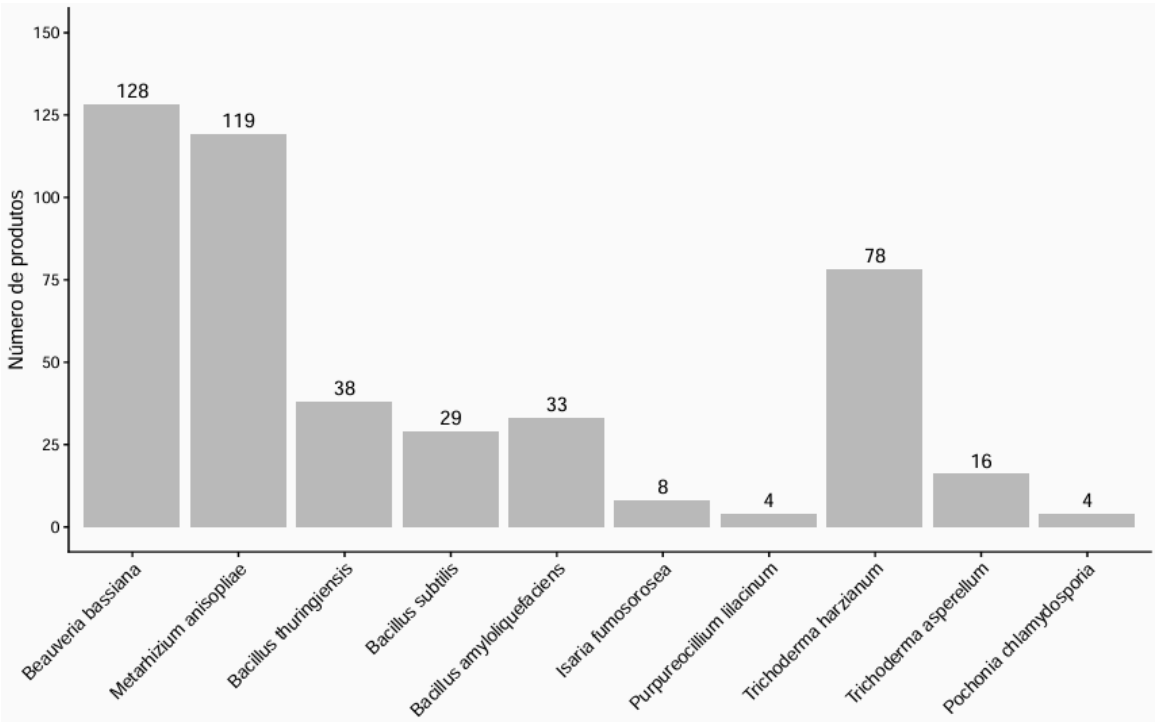


**Figura 2: Número de produtos registrados no Brasil derivados de diferentes microrganismos usados no controle biológico de pragas agrícolas.** Adaptado de Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2025.

Uma das principais vantagens do uso de bioinseticidas é a redução de danos ambientais. Diferente dos defensivos agrícolas, que causam danos irreparáveis no ambiente contaminando a água, solo e organismo não-alvos. *B. bassiana* é um microrganismo biodegradável cuja presença no ambiente é autorregulada, não causando acúmulos de resíduos tóxicos (LACEY et al., 2015). O fungo tem a capacidade de se decompor naturalmente após realizar o biocontrole reduzindo os riscos de poluição. *B. bassiana* acaba reduzindo o risco de desenvolvimento de resistência das pragas. Já os defensivos agrícolas atuam em alvos fisiológicos específicos, que acabam tornando a seleção rápida de resistência de indivíduos resistentes (KHAN et al., 2020). Os mecanismos de virulência e infecção de *B. bassiana* são multifatoriais, ou seja é a ação de diversas enzimas, metabólitos tóxicos, como também uma invasão fúngica **(Figura 3)** (VEGA et al., 2009). Isso acaba reduzindo significativamente as chances de que haja resistência nas populações de insetos que ficam expostas ao bioinseticida (LACEY et al., 2015).

*B. bassiana* é também considerado um organismo de importância para pesquisas que envolvem a virulência de fungos entomopatogênicos, desempenhando um papel relevante na compreensão das ferramentas moleculares que regem a interação entre fungos e insetos hospedeiros **(Figura 3)**. (WANG; ST; WANG, 2016). A produção de metabólitos secundários tóxicos, como a beauvericina e a bassianolida, por exemplo, tem um papel fundamental na virulência e na modulação do sistema imunológico do inseto (PEDRINI, 2022). Pesquisas para entender a regulação biossintética dessas toxinas é de grande importância para desenvolver linhagens geneticamente modificadas com maior eficiência ou segurança ambiental. O uso de engenharia genética, como por exemplo a utilização do sistema CRISPR/Cas9, permite fazer alterações eficientes no genoma do fungo (CHEN et al., 2017). Essas tecnologias ajudam não apenas no aumento da virulência, como também diminui riscos ecológicos.

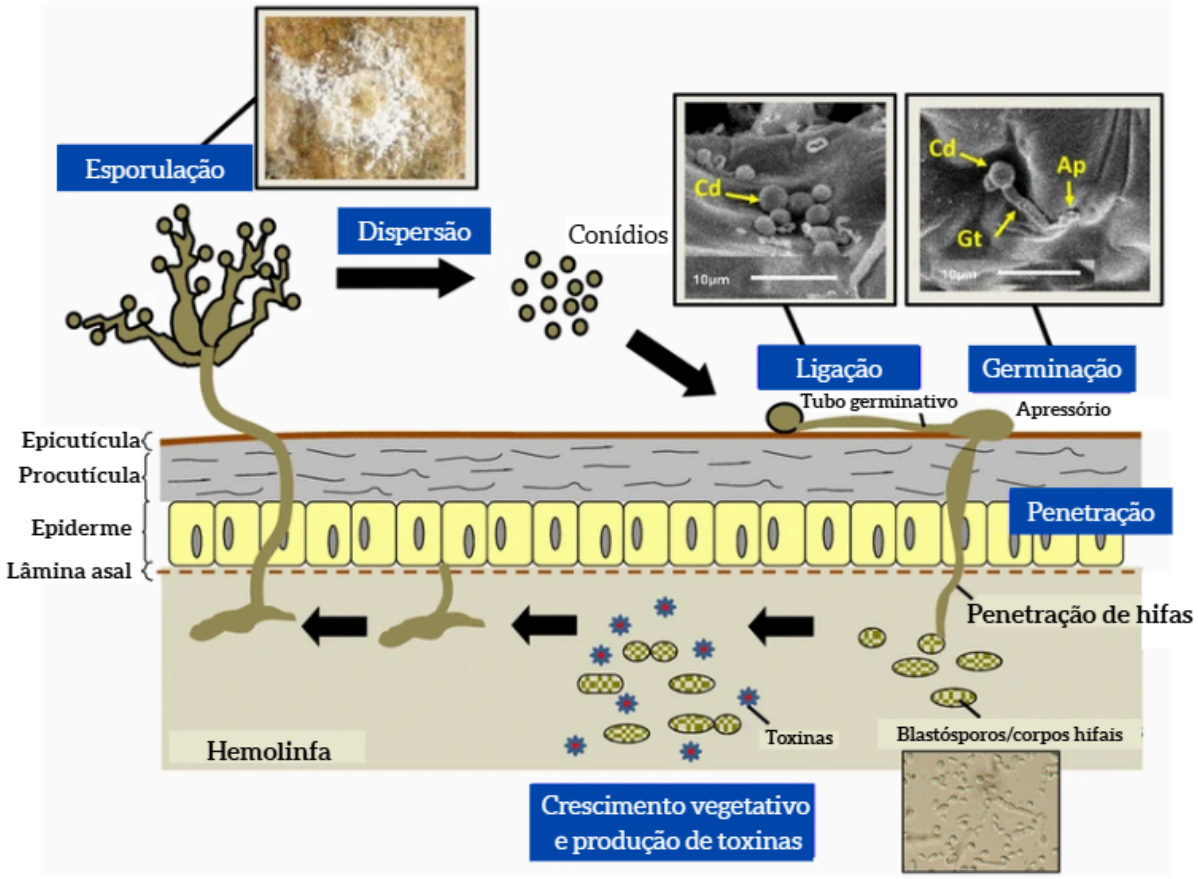



**Figura 3: Ciclo de infecção de fungos entomopatogênicos.** Após a esporulação e dispersão, os conídios aderem à cutícula do inseto, germinam formando apressório e penetram o tegumento por hifas de penetração. No interior do hospedeiro, ocorre crescimento vegetativo, produção de toxinas e formação de blastosporos/hifas, levando à colonização da hemolinfa e morte do inseto, finalizando com nova esporulação. Abreviações: Cd – conídio; Gt – tubo germinativo; Ap – apressório. Adaptado de MASCARIN; JARONSKI, 2016.

### 1.3. Estratégias de transformação do fungo *B. bassiana*

A manipulação genética de fungos filamentosos, como *B. bassiana*, desempenha um papel importante para a pesquisa básica e para aplicações biotecnológicas (AL KHOURY et al., 2019). A transformação genética ocorre quando há a introdução de um material genético exógeno dentro do genoma do fungo, ocorrendo por integração sítio dirigida ou por integração aleatória (WANG

et al., 2013). No caso de *B. bassiana*, esse método é empregado com objetivos diferentes variando desde *knockout* (deleção de um gene), superexpressão (aumento da expressão de um gene por troca alélica de promotores) ou até silenciamento por RNA de interferência (RNAi) (XIAO et al., 2012).

Quando envolve controle biológico, a transformação genética permite melhorar ferramentas importantes do fungo (MASCARIN et al., 2024). Alguns estudos mostraram um aumento da virulência quando há inserção de genes envolvidos na produção de toxinas, além da resistência à radiação UV pela expressão de enzimas que reparam o DNA (WANG; ST LEGER, 2007). Contudo, a transformação genética de fungos filamentosos apresenta certos desafios que podem prejudicar sua eficiência. Um dos exemplos é a parede celular que apresenta uma estrutura resiste e bastante complexa, formada por quitina, β-glucanas e proteínas, e que atua como uma barreira física contra a entrada de macromoléculas, incluindo DNA exógeno (BOWMAN & FREE, 2006). Diante disso, a transformação direta exige estratégias que promovam a remoção parcial dessa estrutura com enzimas líticas, gerando protoplastos (YING & FENG, 2019). A eficiência da transformação em *B. bassiana* depende de qual abordagem é empregada. Técnicas como biolística e eletroporação frequentemente apresentam limitações, pois nem todo DNA exógeno consegue alcançar o núcleo ou se integrar corretamente ao genoma. Além disso, mesmo quando ocorre a integração, o DNA pode se manter instável, dificultando sua inserção duradoura e expressão confiável no fungo (REIS et al., 2004). Adicionalmente, alguns efeitos de inserções aleatórias podem ocasionar mutações indesejadas ou silenciamento gênico, alterando o *fitness* do organismo. Ainda, grande parte dos fungos filamentosos possuem mecanismos de defesa contra DNA exógeno, como o silenciamento gênico ou a interferência por RNA (RNAi), que podem levar à inativação dos genes inseridos (XIA et al., 2013).

A transformação genética de *B. bassiana* pode ser realizada por diferentes métodos, tendo vantagens e limitações em relação a eficiência e estabilidade da transformação. Um dos métodos mais utilizados é a transformação de protoplastos, que ocorre devido à remoção enzimática da

parede celular fúngica, formando células sem proteção externa, facilitando a entrada de DNA exógeno. A transformação por protoplastos tem algumas limitações como a preparação trabalhosa de protoplastos frágeis, bem como a baixa eficiência (ZHANG et al., 2016). Já a transformação mediada por *Agrobacterium* explora a capacidade da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* de transferir DNA para células eucarióticas (REIS et al., 2004), porém não é tão viável para realizar a deleção de genes (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2017). Diante disso, a transformação de fungos utilizando blastosporos tem se mostrado uma estratégia eficiente. Esse sistema oferece a vantagem de permitir a preparação relativamente simples de células competentes, além de possibilitar a preservação dos blastosporos por períodos mais longos sem perda significativa da viabilidade. Dessa forma, a técnica facilita a introdução de DNA exógeno em fungos filamentosos, tornando os experimentos de manipulação genética mais reprodutíveis e acessíveis em comparação a métodos que exigem condições mais complexas ou delicadas (MAGAÑA-ORTÍZ et al., 2013).

### 1.3.1 Marcas de seleção dominantes no fungo *B. bassiana*

Marcas de seleção dominantes são genes incorporados em organismos a partir de métodos de transformação genética, ou seja, servem para selecionar células em que insere em que o material genético de interesse foi inserido com sucesso e como ferramentas críticas de identificação. Esses marcadores funcionam diante da expressão de genes que atribuem fenótipo detectável, como a resistência agentes de seleção (antibióticos, herbicidas ou outro composto tóxicos), que acabam permitindo uma distinção entre as células transformadas e não transformadas em meios de cultura seletivos (PUNT et al., 2002).

A ideia desses marcadores é a expressão de certas proteínas que conferem resistência a agentes de seleção. Estes, quando são integrados ao genoma por distintos métodos de transformação, permitem que as células transformadas consigam proliferar e sobreviver nos meios de seleção contendo a marca. Esta técnica de seleção positiva atua por meio de três principais

mecanismos moleculares. Um deles é a modificação química do agente seletivo, como ocorre com a higromicina B fosfotransferase, que fosforila e inativa o antibiótico. No caso do glifosato, a resistência é conferida por alterações no alvo molecular do composto, impedindo sua ação tóxica. (DILL et al., 2008), bem como a ativação de sistemas de efluxo que retiram a substância tóxica da célula (PEDRINI et al., 2013).

Diversas marcas de seleção dominantes têm sido utilizadas para a transformação genética de *B. bassiana*, visando facilitar a manipulação genética desse fungo entomopatogênico. Entre as mais comuns, destacam-se os genes que conferem resistência a antibióticos e herbicidas. Por exemplo, o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina, foi utilizado em sistemas de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (FANG et al., 2004). Além disso, genes como hph (higromicina B fosfotransferase) e neo (neomicina fosfotransferase) têm sido empregados em estudos de transformação de fungos filamentosos, incluindo *B. bassiana* (SWATI SUREKA et al., 2014). Contudo, a eficácia desses marcadores pode ser limitada pela resistência intrínseca de algumas linhagens de *B. bassiana* a certos antibióticos, como a higromicina B, neomicina e zeocina (ZHANG et al., 2010) **(Figura 4)**. Além disso, a aplicação de sistemas de edição genômica, como o *CRISPR/Cas9*, em *B. bassiana* enfrenta desafios devido à falta de marcadores de seleção dominantes adequados (TRAN et al., 2020). Portanto, a escolha do marcador de seleção dominante deve considerar a linhagem específica de *B. bassiana* utilizada e os objetivos do estudo, sendo essencial avaliar a eficácia e a resistência do fungo ao marcador escolhido.

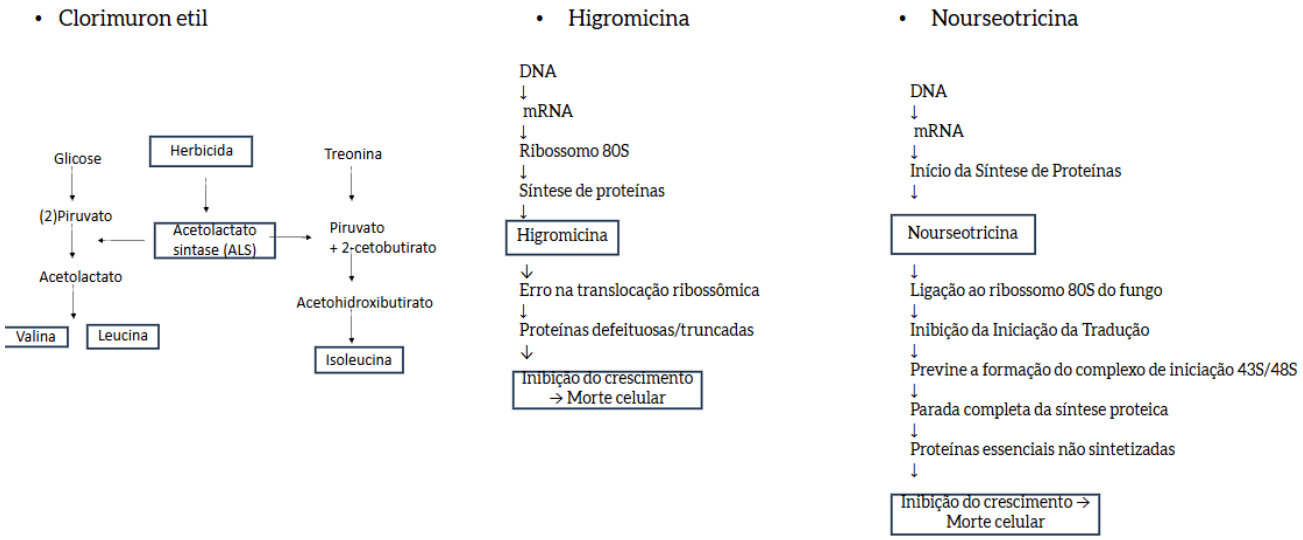



**Figura 4: Mecanismos de Ação de Compostos.** O diagrama ilustra os mecanismos de ação de três agentes distintos: Clorimuron etil, Higromicina e Nourseotricina, cada um atuando em diferentes etapas do metabolismo ou da síntese proteica.

### 1.3.2 Marcas de seleção auxotróficas no fungo *B. bassiana*

As marcas de seleção auxotróficas são genes complementares introduzidos em um organismo para suprir uma deficiência metabólica pré-existente na linhagem hospedeira (FINCHAM, 1989), como no caso de um organismo incapaz de sintetizar um composto que é essencial para o seu crescimento (LV et al., 2015). Essa deficiência é resultante de uma mutação genética que inativa uma enzima associada à via de biossíntese de um determinado composto (NGUYEN et al., 2017). A eficiência dos marcadores auxotróficos requer o uso de uma linhagem hospedeira que apresente mutação para o gene similar. Ou seja, a linhagem é auxotrófica para um determinado nutriente, tornando-se incapaz de sintetizar o metabólito. Por exemplo, uma linhagem *pyrG* mutante é incapaz de sintetizar uridina (THAI et al., 2021).

No mecanismo de seleção auxotrófica, a transformação com um gene marcador funcional restaura a capacidade da célula de sintetizar um metabólito essencial. Esse processo é realizado cultivando-se as células transformadas em meio mínimo, no qual o composto ausente não poderia ser sintetizado pela linhagem original (SCHNEIDER et al., 2008). Somente células transformadas

com o alelo não mutado são capazes de sintetizar o nutriente, e consequentemente conseguem desenvolver-se e se multiplicar no meio seletivo (ULFSTEDT et al., 2017). Ao contrário do que ocorre nos marcadores dominantes, os marcadores auxotróficos necessitam de uma linhagem mutante específica (Schneider et al., 2008). Os marcadores dominantes apresentam uma nova função à célula (por exemplo, resistência a um antibiótico), no entanto os marcadores auxotróficos reparam uma deficiência já pré-existente (ZHANG et al., 2010).

Existem uma infinidade de genes marcadores auxotróficos que são utilizados em fungos, como os genes envolvidos na síntese de pirimidinas (*pyrG*) (THAI et al., 2021), histidina (*hisB*) (THAI et al., 2021), arginina (*argB*), ou na assimilação de nitrogênio (*niaD*) (ZHENG et al., 2015). O gene *niaD*, que codifica a enzima nitrato redutase, é essencial para a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio. Uma linhagem *niaD* mutante só consegue crescer em meios que contém outras fontes de nitrogênio, por exemplo o amônio (ZHENG et al., 2015). O uso de marcadores auxotróficos, como *pyrG* (THAI et al., 2021), tem se mostrado eficiente para a transferência de genes em *Aspergillus oryzae* (THAI et al., 2021).

## 1.4 Utilização de transformação por métodos de co-seleção em fungos filamentosos

A co-seleção é um método fundamental para transformação genética de fungos filamentosos, no qual dois ou mais cassetes de DNA são introduzidos simultaneamente na célula fúngica de interesse (JIANG et al., 2013). Essa estratégia contém um cassete do gene de interesse, enquanto o outro contém um marcador selecionável (JIANG et al., 2013), sendo fundamental para a identificação de transformantes (THAI et al., 2021). Os marcadores podem ser auxotróficos que complementam mutações específicas nos transformantes gerados ou ser marcadores dominantes, entre genes que conferem resistência a antibióticos (THAI et al., 2021).

O princípio da co-seleção é bem estabelecido quando a integração e a expressão são realizadas com êxito de um gene marcador selecionável apresentando uma alta probabilidade de que houve co-integração do gene de interesse (FINCHAM, 1989). A estratégia de co-seleção pode ser realizada por duas técnicas principais de construção de vetores: a co-transformação simultânea, na qual dois plasmídeos são introduzidos juntamente, normalmente ocorre a integração em diferentes locais do genoma (KUCK & HOFF, 2010), como também em vetores bifuncionais quando um único plasmídeo pode ter um gene de interesse + marcador, no qual garante que ambos sejam mantidos (PUNT et al., 1987).

A co-seleção apresenta vantagens importantes, tornando-a uma técnica amplamente empregada na transformação de fungos filamentosos. Esse método permite que a seleção de células transformadas seja mais eficiente, pois as que adquirem resistência a um marcador selecionável têm uma alta probabilidade de também incorporar o gene de interesse. Por exemplo, em estudos com *Aspergillus oryzae*, verificou-se que aproximadamente 92-97% dos clones resistentes à higromicina B, quando transformados com um vetor bifuncional, continham efetivamente o gene alvo modificado, demonstrando a eficácia da estratégia na obtenção de transformantes com o traço desejado. Quando se usa dois plasmídeos diferentes, a eficiência de que uma célula transformada tenha integrado ambos os genes de interesse é menor do que quando se usa apenas um único vetor bifuncional (THAI et al., 2021).

### 1.5. O gene *niaD* como alvo de co-seleção

O gene *niaD* é utilizado como um marcador selecionável em técnicas de transformação genética de fungos filamentosos, através de auxotrofia para nitrato e permitindo a co-seleção de genes de interesse (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 1991). O gene *niaD* tem a função de codificar a enzima nitrato redutase, que é fundamental no metabolismo de nitrogênio em fungos (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 1991). A enzima converte o nitrato em

nitrito, que pode ser convertido em amônio pela nitrito redutase, e consequentemente ser incorporado em aminoácidos e outras moléculas orgânicas essenciais para o crescimento fúngico (GUO et al., 2024). A expressão de *niaD* se dá em decorrência da disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo (SÁMANO et al., 2024). Em condições anaeróbicas, *Aspergillus nidulans* expressa *niaD* mesmo na presença de amônio, fazendo a utilização do produto gênico para a redução dissimilatória de nitrato (TAKASAKI et al., 2004).

Para utilizar o gene *niaD* como marcador de seleção, é necessária que se tenha uma linhagem hospedeira mutante que seja incapaz de crescer na presença de nitrato como única fonte de nitrogênio (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 1991). A construção das linhagens mutantes é geralmente realizada por mutagênese seguida de seleção para resistência ao clorato. O clorato, um análogo químico do nitrato, é tóxico porque, quando convertido pela enzima nitrato redutase em clorito, inibe o crescimento celular fúngico. Dessa forma, as linhagens com o gene *niaD* não funcional não são capazes de resistir ao clorato (MALARDIER et al., 1989).

O mecanismo de seleção ocorre pela transformação da linhagem mutante com uma cópia funcional do gene *niaD*, junto ao gene de interesse, deixando que a estirpe transformada utilize o nitrato como fonte de nitrogênio e consiga crescer na presença dele (MALARDIER et al., 1989). As células que não receberam o gene *niaD* funcional não conseguem crescer (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 1991). O uso do gene *niaD* como um marcador selecionável investiga o princípio da complementação auxotrófica (NAVARRETE et al., 2009). A linhagem mutante é auxotrófica para nitrato, ou seja, não consegue sintetizar o seu próprio nitrogênio, precisando de uma fonte externa (NAVARRETE et al., 2009). Quando ocorre a introdução de um gene *niaD* funcional, o defeito auxotrófico é complementado, permitindo que a linhagem cresça em meio mínimo contendo nitrato (NAVARRETE et al., 2009). Além disto, o gene *niaD* funcional pode servir como marcador para identificar transformantes que eventualmente também receberam o gene de interesse (UNKLES et al., 1989). Esta técnica, especialmente quando envolve a transformação genética, é

particularmente útil quando é difícil selecionar diretamente para o gene de interesse (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 1991).

A estratégia de co-seleção com *niaD* tem importância para pesquisas que visam a manipulação genética de fungos filamentosos (GOUKA et al., 1991). É um método importante para estudar a função dos genes, melhorar as cepas industriais ou desenvolver novas aplicações biotecnológicas (HE et al., 2019). O uso do *niaD* como marcador selecionável pode ser uma forma eficaz e direta de selecionar transformantes, principalmente em organismos com desafios na marcação genética.

### 1.6 Elementos de transposição em fungos filamentosos

Elementos transponíveis (ETs) são segmentos de DNA encontrados em quase todos os genomas dos organismos estudados até o momento. A principal característica desses elementos é a capacidade de se mobilizar, dentro ou entre os genomas (KAZAZIAN, 2004). Embora essa mobilização possa causar efeitos prejudiciais (alterações na expressão gênica, rearranjos cromossômicos) para o genoma do hospedeiro, alguns organismos desenvolveram diversos mecanismos para silenciar a atividade dessas sequências, como o silenciamento pela via do RNAi (CAVALIERE; LATTANZI; ANDRENACCI, 2020). Além disso, os elementos transponíveis servem como uma única fonte de inovação genômica sendo domesticadas para desempenhar funções vitais celulares, como por exemplo componentes do sistema imunológico adaptativo (Chuong et al., 2016).

A diversidade e abundância de elementos transponíveis são marcantes. Existem milhares ou mesmo dezenas de milhares de famílias de ETs em diferentes espécies de plantas, podendo corresponder em até 80% ou mais do DNA genômico total (MICHAEL, 2014). Embora altamente abundantes em plantas, os elementos transponíveis em fungos e metazoários são geralmente menores, mas ainda significativos (3 a 20% em fungos e 3 a 45% em metazoários) (Platt et al., 2016). Do ponto de vista estrutural e mecanístico, os ETs são categorizados em duas classes principais, de acordo com a molécula intermediária no processo de transposição: RNA (classe I ou retrotransposons) ou DNA (classe II ou transposons de DNA). O mecanismo de transposição de

Classe I é conhecido como copiar e colar, pois envolve a síntese de uma molécula intermediária de RNA e inclui retrotransposons LTR (elementos relacionados a retrovírus) e LINEs/SINEs; A Classe II, 'recortar e colar', é diretamente excisada de seu sítio original e inserida em outro, e inclui os transposons Crypton, Helitron, Maverick e TIR (terminal inverted repeats) - **(Figura 5)** (WICKER et al. 2007).

A movimentação dos TEs pode trazer algumas consequências para o genoma como: mutações quando é introduzido um elemento transponível em um gene ocasionando a interrupção da sua função, causando assim uma mutação (RAZALI et al., 2019), rearranjos cromossômicos, quando a recombinação acontece entre ETs pode provocar a inserção, deleções ou até mesmo alterações na estrutura cromossômica (DABOUSSI & CAPY, 2003), a influência na expressão gênica, os elementos transponíveis podem apresentar promotores, além de outros elementos reguladores que afetam a expressão de genes que estão próximos (RAZALI et al., 2019). A inserção de ETs dentro de genes ou perto pode provocar alterações na expressão gênica. podendo aumentar ou diminuir a atividade dos genes (RAZALI et al., 2019).

No contexto da transformação genética, os elementos transponíveis desempenham papéis duplos (MUÑOZ-LÓPEZ et al., 2010). Através de ferramentas de integração, os TEs podem ser utilizados como vetores para inserção de genes em genomas (MUÑOZ-LÓPEZ et al., 2010), já a instabilidade genética porém, o movimento dos TEs pode levar a instabilidade do DNA inserido, provocando rearranjos ou mutações (DABOUSSI, 1997). Em espécies que estão envolvidas no interesse no mercado agrícola e biotecnológico, muitos elementos transponíveis têm sido caracterizados e identificados em fungos filamentosos (FÁVARO et al., 2005). O uso destes elementos endógenos tem induzido investigações mais aprofundadas visando criar bibliotecas extensas de mutantes em diferentes organismos (SCHREVENS & SANGLARD, 2021). Os ETs têm um papel importantíssimo na flexibilidade do genoma, na patogenicidade e na evolução de fitopatógenos fúngicos (RAZALI et al., 2019), sendo uma fonte de evolução adaptativa por intermédio da diversificação do genoma (RAZALI et al., 2019).

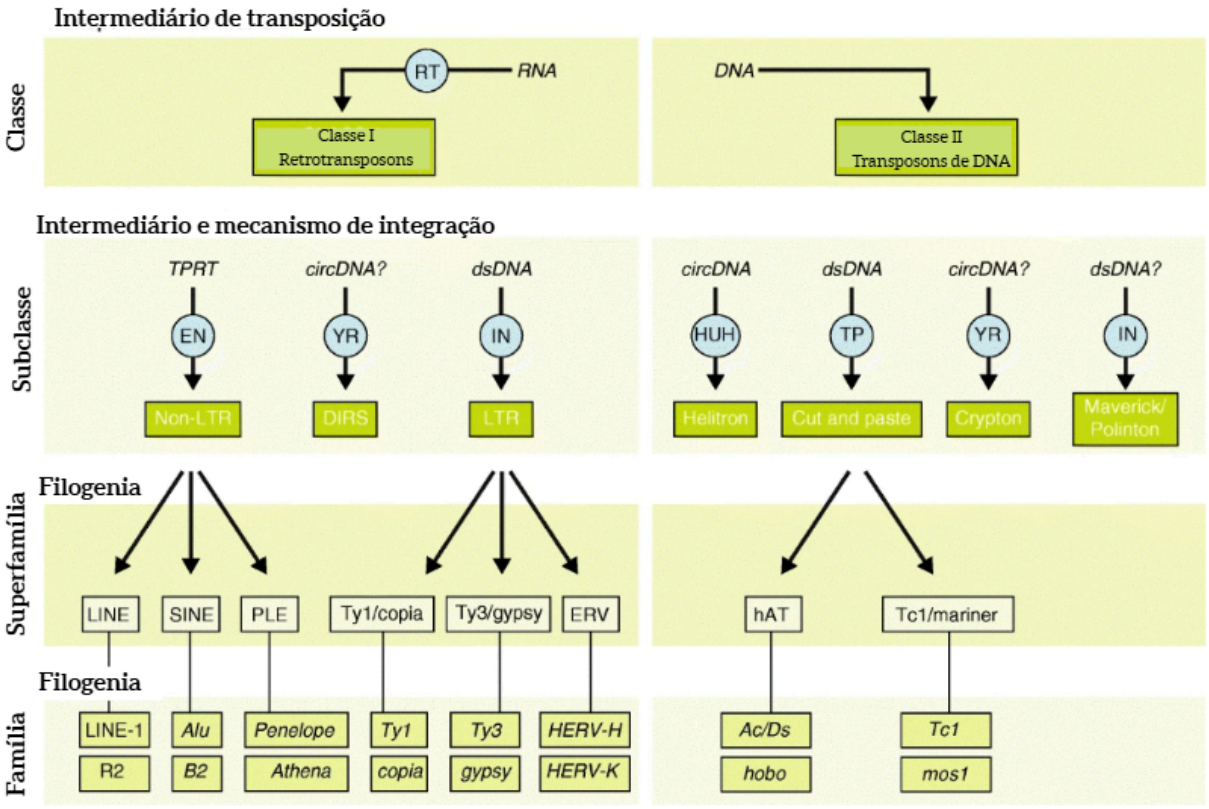



**Figura 5: Classificação de elementos transponíveis eucarióticos**. Esquema e exemplos mostrando as principais características e relações entre classes, subclasses, superfamílias e famílias de TE. Círculos azuis representam enzimas codificadas por TE. circDNA (intermediário de DNA circular), DIRS (sequência repetitiva de Dictyostelium), dsDNA (intermediário de DNA fita dupla linear), EN (endonuclease), IN (integrase), PLEs (elementos semelhantes a Penélope), HUH (proteína Rep/Helicase com atividade de endonuclease HUH), RT (transcriptase reversa), TP (transposase), TPRT (transcrição reversa com primer alvo), YR (recombinase de tirosina). Adaptado de Bourque et al., 2018

## 2. Objetivo Geral

Desenvolvimento de sistemas de transformação em *B. bassiana* baseados em marcas dominantes e auxotróficas

### 2.1 Objetivos específicos

- Identificar gene *niaD* no genoma de *B. bassiana* linhagem AS272
- Caracterizar in silico genes *niaD* de distintas linhagens de *B. bassiana* e seu envolvimento com elementos de transposição
- Avaliar a sensibilidade de *B. bassiana* frente a distintos agentes de seleção e de contra seleção
- Avaliar gene *SUR1 como potencial marca de seleção em B. bassiana*

## 3. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão organizados na forma de dois capítulos. O primeiro (CAPÍTULO I) trata do desenvolvimento de um sistema de transformação baseado na marca dominante *SUR1* no fungo *B. bassiana.* O segundo (CAPÍTULO II) trata da caracterização molecular do elemento de transposição da classe Hupfer em *Beauveria* sendo apresentado na forma de um manuscrito científico a ser submetido para análise junto ao periódico *Genetics and Molecular Biology*.

## CAPÍTULO I

## 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS CAPÍTULO I

### 3.1.1. Linhagens e condições de cultivo

A cepa *B. bassiana* AS272, extraída do solo do Rio Grande do Sul, foi fornecida pelo Grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (LBCMFF) e foi rotineiramente cultivada em meio dextrose Sabouraud (SDB) (m/v: 4% glicose, 1% peptona e 2% ágar). A linhagem de *Escherichia coli* DH10β foi utilizada para propagação de plasmídeos em meio Luria-Bertani, contendo 100 µg/mL de ampicilina. Meio de Czapek-Dox (m/v: 3,0% sacarose, 0,3% $NaNO_3$, 0,1% $K_2HPO_4$, 0,05% KCl, 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001% $FeSO_4$ e 2% ágar) com adição de 10 µg/mL clorimuron-etil foi utilizado como meio seletivo para transformantes.

### 3.1.2. Avaliação do perfil de susceptibilidade de *B. bassiana* a diferentes agentes de seleção

Foi testado o desenvolvimento de *B. bassiana* em meio Czapek adaptado, suplementado com Higromicina, Nourseotricina e Clorimuron-etil. Para avaliação do efeito da Higromicina: 0, 100, 200 e 400 µg/mL. Para avaliar o efeito da nourseotricina foram utilizadas concentrações de 0, 50, 100 e 200µg/mL. Para avaliar o efeito do clorimuron-etil, utilizou-se meio Czapek Convencional acrescido das seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL. Os testes foram realizados em microplacas de 24 poços e cada poço foi inoculado com 1 µL de suspensão de esporos ($10^6$ esporos/mL). Após período de incubação de 7 dias à temperatura de 30 ℃, as placas foram avaliadas quanto a crescimento e desenvolvimento de micélio.

### 3.1.3. Construção vetorial

O plasmídeo inicial pPZP:SUR **(Figura 6)** foi transformado em *E. coli* DH10β por choque térmico (GREEN; ROGERS, 2013) para propagação, seguido do

isolamento do plasmídeo por preparação alcalina (RAJKUMAR; ASHOKUMAR; THAVARANJIT, 2020).

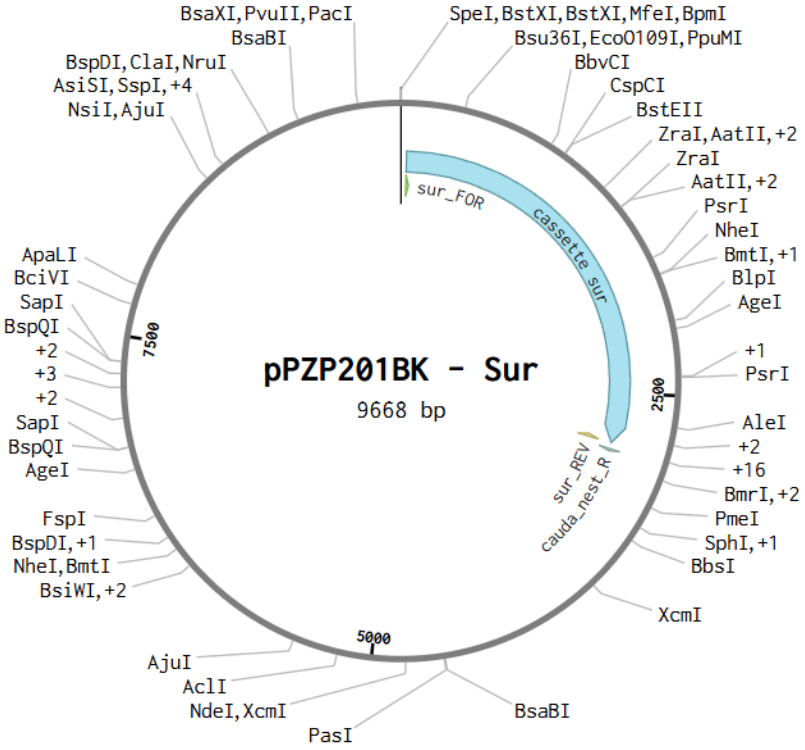



**Figura 6: Mapa genético do plasmídeo pPZP201BK–Sur (9668 pb).** O vetor contém o gene de resistência à ampicilina (AmpR), utilizado para seleção em *E. coli*, e o cassete *SUR*, responsável pela resistência à sulfonilureia em fungos. O cassete *SUR* (~3,0 kb) é composto pelo promotor gpdA, o gene *SUR* e o terminador trpC, derivados de *Aspergillus nidulans*. As posições das principais enzimas de restrição estão indicadas no mapa circular.

### 3.1.4. Preparação de blastosporos

A cultura foi realizada em meio SDB por 48 h, iniciada com os conídios de *B. bassiana* AS272 na concentração de 1 × $10^6$ esporos/mL. A cultura foi incubada com agitação a 28 °C e 180 rpm (YING e FENG, 2006). As culturas resultantes foram filtradas através de filtros de membrana estéreis e os blastosporos foram

coletados por centrifugação de 10 min a 9000 ×g e 4 °C, seguido de lavagem duas vezes com água ultrapura. Os blastosporos coletados foram lavados com 1 M de sorbitol e então suspensos em 0,5 mL da mesma solução. A concentração final para a transformação foi em torno de $5\times 10^8$ blastoporos/mL.

### 3.1.5. Eletroporação

Aos blastosporos foram adicionados quantidade de 1, 2,5 ou 5 µg do produto de PCR referente ao marcador de seleção do gene *SUR1*. A suspensão foi então transferida para uma cubeta pré-resfriada e pulsada usando o eletroporador (Eppendorf Electroporator 2510) nas intensidades de campo de 2,5 kV $cm^{-1}$ para constante de tempo de 5 ms (milisegundos). A suspensão pulsada, juntamente com o resíduo lavado duas vezes com 100 µL de sorbitol 1 M gelado, foi transferida para um tubo Eppendorf, totalizando 200 µL. A suspensão final foi então incubada por 2 h a 28 °C com agitação de 350 RPM e as alíquotas de 60 µL foram espalhadas nas placas do meio seletivo e incubadas a 28 °C. Cada operação foi repetida três vezes.

### 3.1.6. Exame da estabilidade mitótica

Transformantes positivos gerados foram cultivados a 28 °C por 7 dias em placas com ágar Czapek contendo 10 µg/mL de clorimuron-etil. Após duas rodadas de cultivo, uma sem clorimuron-etil e outra com, verificou-se se o fungo mantinha resistência ao composto. A estabilidade mitótica foi considerada positiva quando a resistência à alta concentração de clorimuron-etil foi mantida.

### 3.1.7. Extração de DNAs genômicos

Conídios de quatro transformantes putativos retirados aleatoriamente das placas seletivas, foram inoculados em meio SBD por 48h. A massa micelial fresca foi macerada em almofariz com pistilo com nitrogênio líquido. O DNA dos transformantes foi extraído através de extração por Brometo de

Cetiltrimetilamônio (CTAB). As amostras de DNA genômico foram preparadas segundo Doyle & Doyle (1987).

### 3.1.8. Análise de PCR

Os DNAs genômicos dos transformantes amostrados e da linhagem selvagem foram usados como moldes de PCR para detectar a presença do gene *SUR1* nos transformantes usando os primers SURIF e SURIR (Tabela 1). Primer para o gene da Actina foram utilizados como controle da qualidade da extração de DNA. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um sistema de reação padrão de 25 µL, incluindo 3 min de pré-desnaturação a 94 °C e 35 ciclos de 45 s de desnaturação a 94 °C, 3 min de anelamento a 63 °C e 45 s de extensão a 72 °C, seguidos por 3 min de extensão final a 72 °C. Já o ciclo da actina, inclui 3 min de pré-desnaturação a 95 °C e 40 ciclos de 30 s de desnaturação a 95 °C, 30 s de anelamento a 60 °C e 20 s de extensão a 72 °C, seguidos por 7 min de extensão final a 72 °C. Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

**Tabela 1: Sequências de primers usados na geração de produtos de PCR e nas análises de confirmação da transformação.**

| Primers | Sequências (5´-3´) |
|---|---|
| SURF | 5'-TCGACGTGCCAACGCCACAG-3' |
| SURR | 5'-TCGACGTGAGATAGCATGCAATTC-3' |
| SURIF | 5'-GTTACCCTGGCGGTGCTATC-3' |
| SURIR | 5'-CCTCCGCGTCCTTCAGCAG3' |
| ATCgF | 5'-AGGGTTTCGCTCTTCCTCAC-3' |
| ATCgR | 5'-TCAAGAGCGACGTAGCAGAG-3' |

## 3.2. RESULTADOS 3.2.1 Desenvolvimento de um sistema de transformação baseado na marca de seleção *SUR1*

O desenvolvimento de um sistema de transformação através de uma marca de seleção *SUR1* tem como objetivo facilitar a manipulação genética, no qual permite a identificação e o isolamento eficiente de organismos transformados (JARDAK et al., 2020). A criação de um sistema de transformação é de suma importância para o melhoramento genético de organismos, como também a produção de compostos de interesse biotecnológico (WANG et al., 2021). As técnicas de transformação genética são fundamentais para introduzir genes específicos em células hospedeiras, o que permite a expressão de características novas ou a modificação de funções existentes (ZHANG et al., 2024). A seleção eficiente de transformante é fundamental neste processo, e a utilização de marcadores de seleção como o *SUR1* tendo um papel importante na identificação e no isolamento de células geneticamente modificadas (ZHANG et al., 2024).

A marca de seleção *SUR1* pode ser usada em sistemas de genética a partir da exploração de sensibilidade a determinados compostos ou mecanismos de resistência (ZHANG et al., 2010). Um exemplo, é a introdução do gene *SUR1* em um organismo poder conferir resistência à sulfonilureias, ajudando a seleção de transformantes em meios que contêm esses compostos (ZHANG et al., 2010). A seleção de *SUR1* pode ser usada em diversos organismos como em bactérias, plantas e leveduras, sendo uma ferramenta importante para a engenharia genética (ZHANG et al., 2010). A escolha de um sistema de transformação e de uma marca de seleção adequada depende das características do organismo que for transformado (JARDAK et al., 2020). A marca de seleção *SUR1* disponibiliza uma alternativa eficiente aos marcadores de resistência a antibióticos, no qual podem apresentar riscos à saúde humana e ao meio ambiente (JARDAK et al., 2020). O uso destes sistemas de seleção não letais, como o *SUR1*, pode ajudar o desenvolvimento de transgênicos mais seguros e sustentáveis (JARDAK et al., 2020).

### 3.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

O teste de resistência de *B. bassiana* AS272 foi realizado em diferentes concentrações de higromicina (100 a 400 µg/mL) e nourseotricina (50-200 µg/mL), utilizando os meios de cultura Czapek-Dox e Sabouraud. Após 7 dias, observou-se crescimento fúngico em todas as concentrações testadas, indicando resistência intrínseca da espécie a ambos os antibióticos nas condições avaliadas. Esses resultados sugerem que esses compostos não são eficazes para inibir o crescimento de *B. bassiana*, sendo necessário considerar outros marcadores seletivos em estudos futuros. A resistência observada provavelmente se deve a mecanismos intrínsecos do microrganismo **(Figura 7)**.

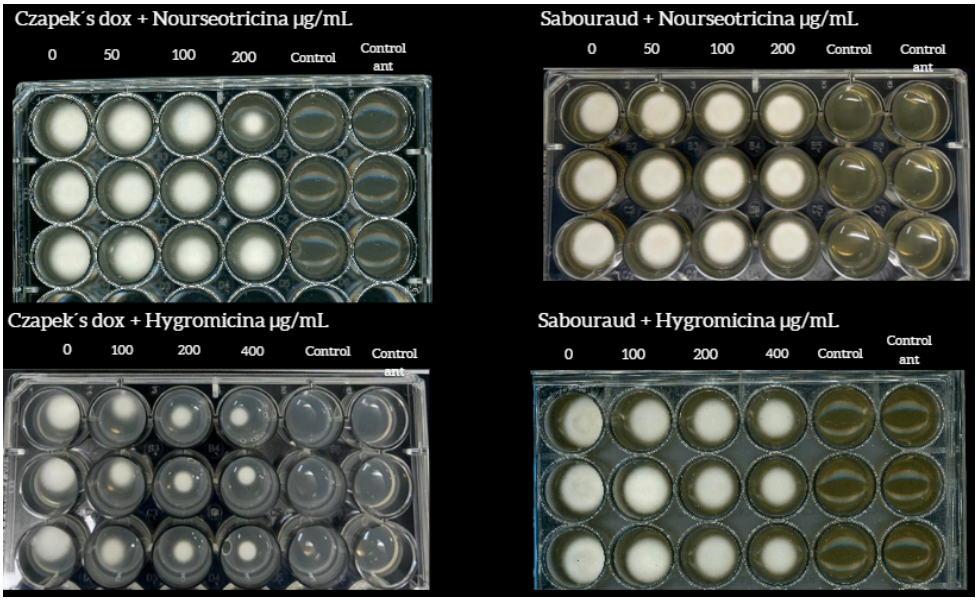



**Figura 7:Teste de sensibilidade de *B. bassiana* AS272 a higromicina e nourseotricina**. (em cima ) Teste de sensibilidade à nourseotricina. (em baixo) Teste de sensibilidade à higromicina. Para cada antibiótico, a linhagem selvagem AS272 foi inoculada em meio Czapek-Dox (painel esquerdo e Sabouraud (painel esquerdo), suplementados com concentrações crescentes do agente (0 a 200 µg/mL de nourseotricina; 0 a 400 µg/mL de higromicina). Os testes foram realizados em triplicata biológica. Control": meio sólido, Control ant": meio sólido com antibiótico.

A análise da sensibilidade de *B. bassiana* AS272 a clorimuron-etil revelou que a concentração de 10 µg/mL foi eficaz como ponto de seleção. Crescimento fúngico foi registrado nas concentrações de 0 e 5 µg/mL, enquanto

concentrações a partir de 10 µg/mL inibiram o crescimento. A ausência de desenvolvimento do micélio em 20, 50 e 100 µg/mL indica que essas doses são letais para a linhagem selvagem. Dessa forma, o ensaio determinou que 10 µg/mL corresponde à concentração inibitória mínima (CIM), capaz de diferenciar células transformadas de não transformadas, tornando-se uma ferramenta crucial para a aplicação como pressão seletiva em experimentos de transformação genética **(Figura 8)**.

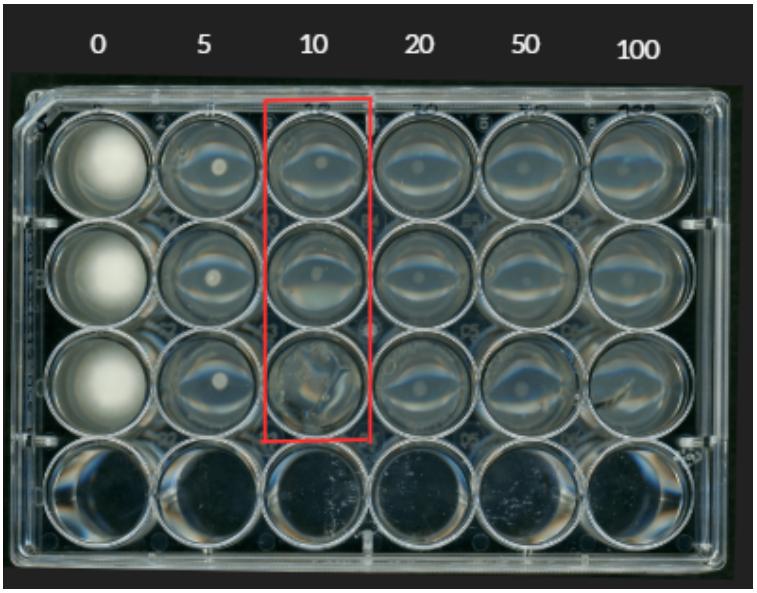



**Figura 8: Teste de sensibilidade de *B. bassiana* AS272 ao clorimuron-etil.** O fungo foi cultivado em meio sólido com concentrações crescentes do herbicida (0, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL). A imagem foi capturada após 7 dias de incubação a 30°C, demonstrando a inibição progressiva do crescimento micelial com o aumento da concentração.

Para a transformação de *B. bassiana* AS272, utilizou-se o gene *SUR1*, amplificado a partir do plasmídeo pPZPSUR1 **(Figura 9)**. Diferentes concentrações de DNA foram testadas durante a eletroporação de blastosporos, resultando na formação de diversas colônias. A avaliação do crescimento em meio seletivo contendo clorimuron-etil (10 µg/mL) demonstrou a eficiência da seleção de transformantes. Na placa controle com a linhagem selvagem, nenhum crescimento foi observado, indicando que a concentração do herbicida foi suficiente para inibir células não transformadas. Por outro lado, nas placas

contendo os transformantes, foi registrado crescimento fúngico no meio seletivo, confirmando a presença do gene *SUR1* e a eficácia do marcador utilizado. Esses resultados evidenciam o sucesso da transformação genética de *B. bassiana* e a eficiência do sistema de seleção empregado **(Figura 9)**.

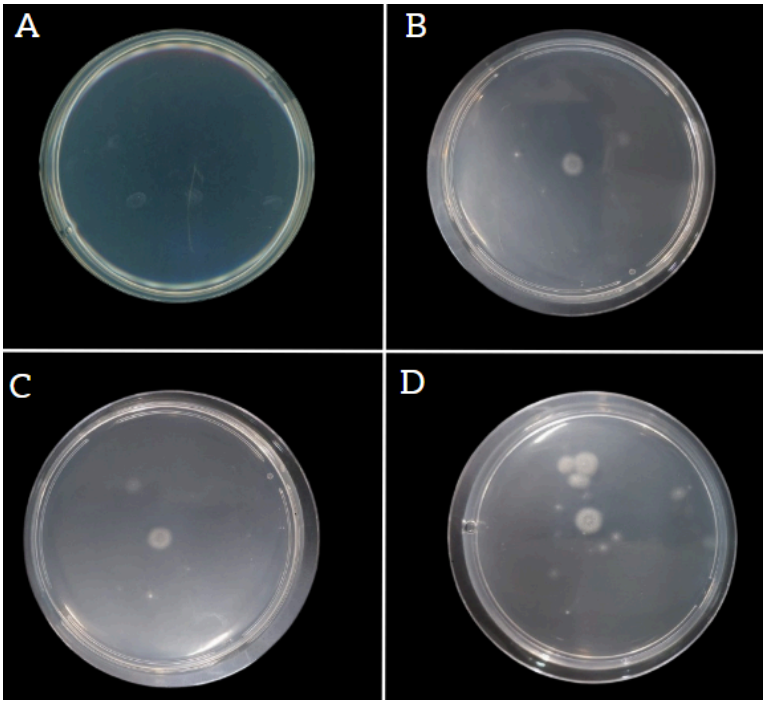



**Figura 9: Crescimento de transformantes de *B. bassiana* em clorimuron-etil.** Crescimento do transformante de *B. bassiana* em meio Czapek Dox + clorimuron-etil com concentração de 10 µg/mL. (A) Controle, (B - D), distintos experimentos de transformação com *amplicon SUR1*.

Observa-se que a quantidade de DNA está relacionada com o aumento na quantidade de colônias que foram transformadas, isso mostra que há influência diretamente na eficiência de transformação **(Figura 10)**. Com a concentração DNA plasmidial de 1 µg, observamos crescimento de apenas 4 colônias transformadas, apresentando uma baixa taxa de transformação. Na concentração de 2,5 µg, teve pouca diferença no número de colônias em comparação a 1 ug, já na concentração de 5 µg gerou um número maior de colônias transformadas. Esse resultado mostra que quando aumenta a quantidade de amplicon acaba favorecendo a entrada e integração no genoma, elevando a frequência de colônias resistentes.

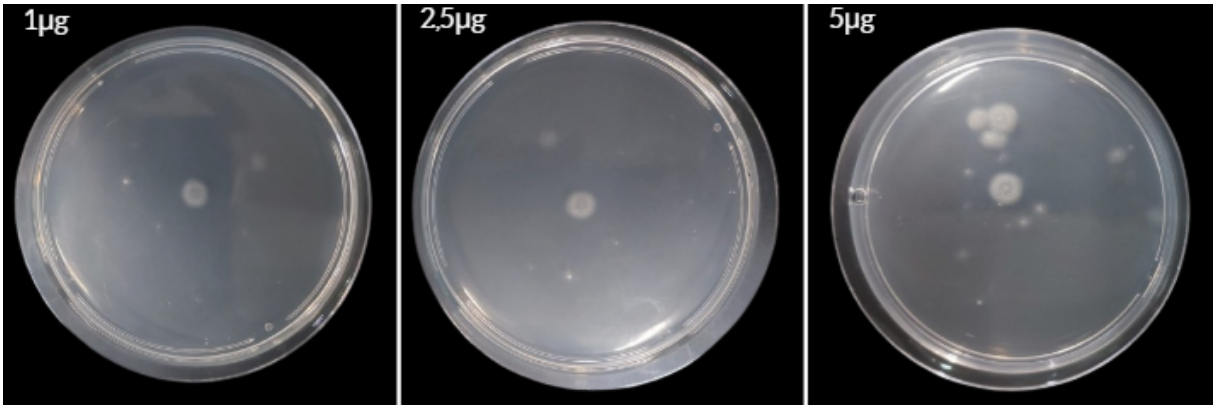



**Figura 10: Crescimento de colônias após transformação com diferentes concentrações de amplicon** Placas de seleção empregando amplicons na quantidade de 1 µg, 2,5 µg e 5 µg de DNA mostram variação no número de colônias obtidas, indicando aumento na eficiência de transformação com maiores quantidades de DNA. Sendo realizada triplicada para a veracidade dos resultados.

No gráfico de distribuição do número de colônias obtidas em diferentes concentrações do agente seletivo **(Figura 11)**, pode-se observar que em quantidade de 1 µg de amplicon, o número de colônias foi baixo, com uma mediana baixa e uma maior dispersão dos valores, mostrando menor eficiência na formação de colônias quanto maior variabilidade entre as repetições. Quando comparado a quantidades de 2,5 µg e 5 µg de amplicon, o número de colônias foi superior em relação à concentração mais baixa, exibindo medianas mais elevadas e uma distribuição de dados mais coesos ($F = 6,761$; $p = 0,00469$). Esses resultados mostram que concentrações mais elevadas resultam na recuperação de maior número de colônias, proporcionando não apenas maior quantidade, como também uma maior estabilidade nos valores alcançados.

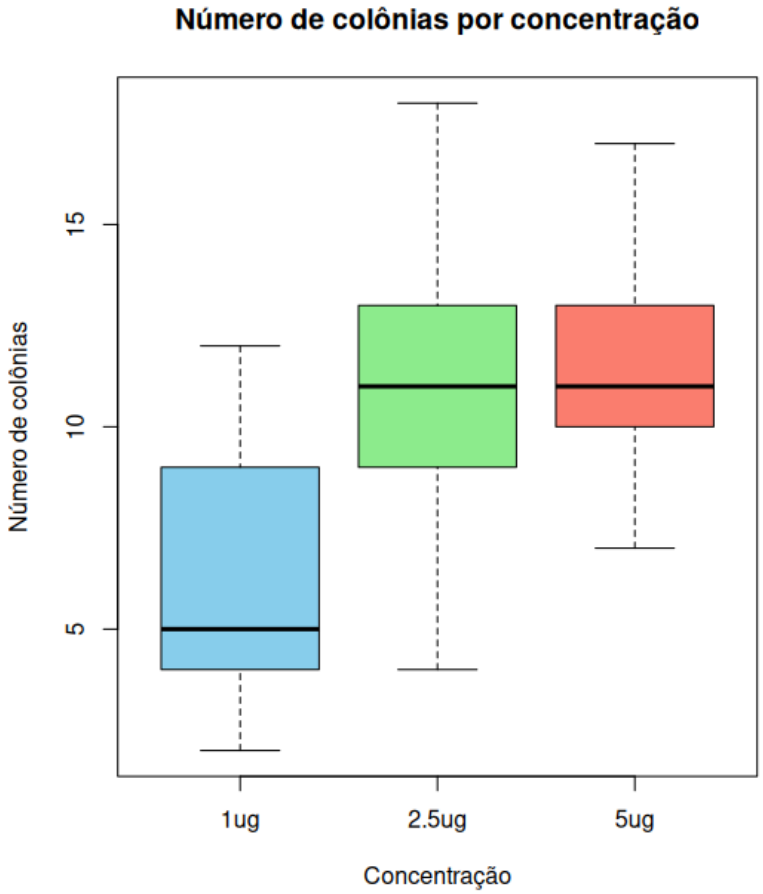



**Figura 11: Distribuição do número de colônias obtidas em diferentes concentrações do amplicon (1 µg, 2,5 µg e 5 µg).** Cada boxplot representa a variação dos valores observados, indicando a mediana, quartis e possíveis outliers (pontos individuais). Observa-se tendência de aumento no número de colônias com concentrações mais elevadas.

A avaliação da sensibilidade dos transformantes de *B. bassiana* AS272 ao clorimuron-etil revelou crescimento robusto em todas as concentrações testadas (5-100 µg/mL), indicando que o marcador introduzido durante a transformação foi funcional e conferiu resistência ao herbicida. Em contraste, a linhagem selvagem apresentou crescimento inibido em concentrações superiores a 10 µg/mL, evidenciando a eficácia do herbicida em células não transformadas. As colônias transformadas, por outro lado, exibiram crescimento uniforme mesmo em concentrações elevadas, confirmando a efetividade do cassete de seleção e demonstrando que a integração do gene no genoma do fungo foi estável. Foi realizada duas rodadas de cultivo, uma sem o clorimuron-etil e outra com, a fim

de verificar se o fungo mantém resistência ao composto. Esses resultados reforçam o sucesso da transformação genética de *B. bassiana* e a confiabilidade do marcador utilizado como ferramenta de seleção **(Figura 12)**.

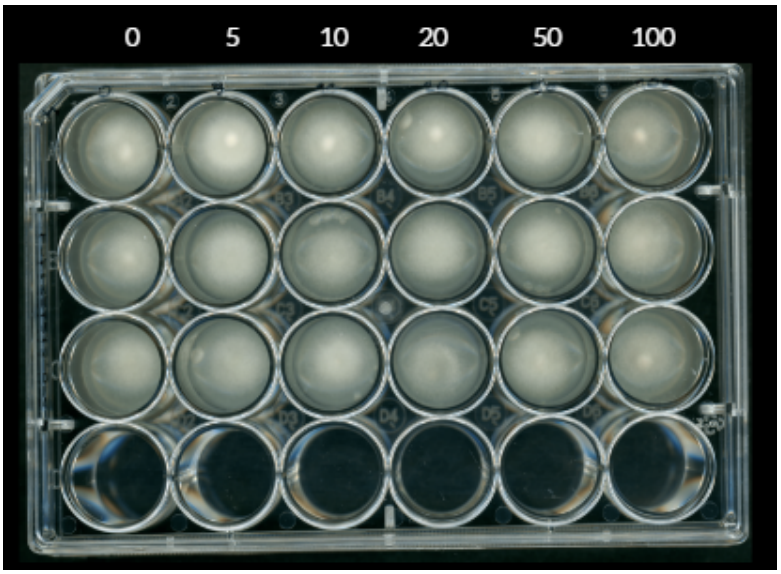



**Figura 12: Teste de sensibilidade de *Beauveria bassiana* ao clorimuron-etil.** O crescimento de um transformante representativo foi avaliado em meio czapek´dox com concentrações crescentes de clorimuron-etil (0, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL). Feito em triplicata para cada concentração, demonstrando a reprodutibilidade do resultado. Após 7 dias de incubação, evidenciando o crescimento micelial em todas concentrações testadas.

A análise por PCR do gene *SUR1* em *B. bassiana* AS272 permitiu confirmar a integração do fragmento de interesse nos transformantes **(Figura 13)**. No gel de eletroforese, o marcador molecular (M) apresentou bandas de referência bem definidas, permitindo a correta estimativa do tamanho do *amplicon*, que corresponde a 1,8 kB. O controle positivo (PC) exibiu uma banda clara no tamanho esperado, confirmando que a reação de PCR ocorreu adequadamente. O controle negativo (NC), por sua vez, não apresentou amplificação, assegurando que não houve contaminação ou reação inespecífica. Nas amostras dos transformantes (T), observou-se que as bandas apresentavam mobilidade idêntica à do controle positivo, demonstrando de forma consistente a presença do gene *SUR1* nos clones analisados. A linhagem

selvagem (WT) não exibiu nenhum sinal de amplificação, reforçando que a presença do gene nas transformantes resulta da inserção experimental e não de sequências endógenas. Esses resultados confirmam que a integração do cassete de seleção foi bem-sucedida, permitindo a expressão funcional do marcador e corroborando a eficiência do processo de transformação genética em *B. bassiana*.

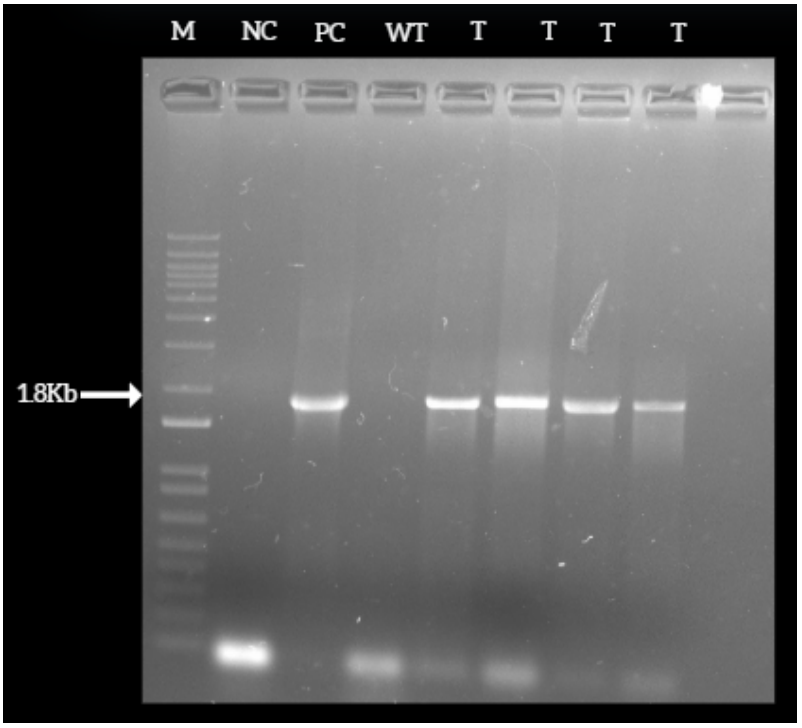



**Figura 13: Análise de PCR do gene SUR1 em *B. bassiana* AS272 selvagem e transformante**. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular. NC: Controle negativo da reação de PCR. PC: Controle positivo (plasmídeo pBARGPE1-SUR contendo o gene SUR). WT: Linhagem selvagem AS272 (controle negativo genômico). T1 a T4: Diferentes linhagens transformantes independentes. A amplificação de uma banda de tamanho esperado (1800 pb) exclusivamente nos canais PC, T1, T2, T3 e T4 confirma a integração estável do gene SUR no genoma dos transformantes.

## CAPÍTULO II

Este trabalho trata da caracterização *in silico* de um elemento de transposição da classe *hupfer* em genomas de *Beauveria.* Os resultados obtidos estão organizados em um manuscrito científico, formatado conforme normas do periódico *Genetics and Molecular Biology*.
(**https://www.gmB.org.br/instructions-to-authors** **)**

**Distribution and evidence for horizontal transfer of the hupfer transposon in *Cordycipitaceae* (*Ascomycota*)**

Matheus Lopes Braga[1], Henrique R.M. Antoniolli[2], and Charley Christian Staats*[1,2]

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;
2. Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

**Short title:** Horizontal Transfer of *hupfer* in *Cordycipitaceae*

**Key-words:** Transposable elements, *hupfer* transposons, horizontal transfer, *Cordycipitaceae*,

*Corresponding author: Charley Christian Staats
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
E-mail: staats@ufrgs.br
ORCID: 0000-0002-2433-6903

**Abstract**

Transposable elements (TEs) are linear DNA sequences that are able to mobilize within genomes and can be found in all biological kingdoms. The present study analyzed the distribution and presence of *hupfer* transposons in ascomycete species of *Cordycipitaceae*, investigating their evolutionary history and possible horizontal transfer events (HTT). Genome assemblies retrieved from GenBank were analyzed, using BLASTn searches and similarity criteria. Phylogenetic analyses were conducted for comparing the evolution of *hupfer* elements with the phylogeny of the host organisms. The results showed the presence of the *hupfer* element in species of *Cordyceps* and *Beauveria*, suggesting HTT events associated with topological inconsistencies. The VHICA package revealed atypical patterns of divergence between conserved nuclear genes, as well as *hupfer* elements. In this sense, abundance analyses with whole-genome sequencing data showed that there is intraspecific variation in the distribution and copies of elements. The results here shown contribute to understanding the genomic evolution of *Cordycipitaceae* and show that TEs play an important role in genetic diversification and host adaptation.

## Introduction

Transposable elements (TEs) are linear DNA sequences that are found in all organisms with sequenced genomes to date. The main characteristic of these elements is the ability to mobilize, or be mobilized, between or within genomes (Bourque et al., 2018). Although this mobilization may cause negative effects for the host genomes, including changes in gene expression and chromosomal rearrangements, they evolved several mechanisms to silence the activity of these sequences, such as the silencing by the RNAi pathway (Cornec, 2023). In addition, many sequences end up being domesticated in genes that perform essential biological functions, such as regulation of gene expression, as well as enzymes derived from TEs (Brown et al., 1993).

Transposable elements are present in all kingdoms, and TEs are highly diverse. For instance, there are thousands or even tens of thousands of TE families in different plant species, constituting up to 80% of the total genomic DNA (Wicker et al. 2007). Although highly abundant in plants, TEs in fungi and metazoans represent a lower, but still considerable, portion of their genomes (3–20% in fungi and 3–45% in metazoans). Classification systems (Finnegan,1989; Wicker et al., 2007) differentiate TEs firstly into two main classes, according to the intermediate molecule in the transposition process: RNA (Class I, or retrotransposons) or DNA (Class II, or DNA transposons). The Class I transposition mechanism is also known as “copy and paste”, since it involves the synthesis of an intermediate RNA molecule, and includes LTR retrotransposons (retrovirus-related elements) and LINEs/SINEs; Class II, “cut and paste”, are directly excised from their original site and inserted into another,

and includes Crypton, Helitron, Maverick and TIR (terminal inverted repeats) transposons (Wicker et al. 2007).

Horizontal transfer events are a mechanism in which organisms acquire genetic material from sources other than their generators (i.e., there is no vertical inheritance). It is a very common phenomenon in bacteria, but it also occurs in other organisms, which has consequences for evolution, biotechnology and ecology (Kidwell MG, 1992). The main horizontal transfer events are: Transformation, Transduction, Conjugation and Transposon-Mediated Transfer. These types of events are extremely important for understanding evolution, as they allow rapid adaptations, such as acquiring new metabolic capabilities. Although fungi do not transduce, conjugate or transform in the same way as bacteria, they have developed alternative THG techniques, such as mobile genetic elements that transfer genes between species, an example being *Fusarium oxysporum*, which has acquired virulence genes in this way (Ma et al., 2010). There are also fungal plasmids present in *Fusarium* that act as THG vectors (Galagan et al., 2003).

The *hupfer* element is a TIR transposon, the firstly identified in *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungus of fundamental agricultural and biotechnological importance (Maurer et al., 1997). Its discovery was made through the analysis of fragment clones and the sequence of the *niaD* gene, with typical structure of moving elements, showing around 3,336 bp and an ORF (open reading frame) extending from position 306 to 1,271. The putative protein encoded by this ORF has 321 amino acids in length, and looks like transposases that contain the DDE (a conserved Asp-Asp-Glu triad involved in DNA cleavage

and integration) catalytic motif in its C-terminal domain–which is typical of many mobilizing DNAs (Maurer et al., 1997). Even though it was initially described in *B. bassiana*, the phylogenetic distribution of *hupfer* is still unknown. The presence of *hupfer* in *Beauveria* raises one's hopes for the family profile in other lineages and for its capabilities in terms of functional roles in fungal genomics. Given that *hupfer* has TIRs and transposase domains, it is unreasonable to rule out the potential that there are mobile elements, which could also have implications for another use as a transgenic vector in *B. bassiana*, or in other filamentous fungi. If those elements display functional activity, they may also facilitate the identification of new pathways potentially leading to genetic improvements, and establishing evolutionary timeframes.

This study aimed to search for and reconstruct the evolutionary history of *hupfer* elements in *Cordycipitaceae* species. This study also aims to investigate and characterize possible horizontal transfer events that somehow contributed to the introduction or even the spread of the *hupfer* element among different species, in an attempt to find a hypothesis of evolutionary mechanisms derived from this process.

## Material and methods

### *Searches for hupfer in Cordycipitaceae*

Representative genome assemblies from the family *Cordycipitaceae* were fetched from GenBank, using a Python script (https://github.com/kblin/ncbi-genome-download). Taxonomy and accession numbers are detailed in Table S1. To evaluate completeness and quality, BUSCO

v5 (Manni et al., 2021) was run with the Ascomycota database. The *hupfer* transposon sequence characterized by Maurer et al. (1997) was used as a query in BLASTn searches against the genomic assemblies, applying the 80-80-80 rule of Wicker et al. (2007): a sequence of at least 80 base pairs (bp) with 80% identity and 80% coverage. This first round of BLASTn searches returned significant results only within the genera *Cordyceps* and *Beauveria*. All genomes from these two taxa available in GenBank were subsequently downloaded for intraspecific analysis. All *hupfer* sequences found in the BLASTn step were concatenated and employed as a custom library for a second round of annotations with RepeatMasker (Smit et al., 2024).

*Phylogenetic analyses*

The nucleotide sequences encoding the transposase (TPase) of each *hupfer* copy were aligned using the *alignSequences* subprogram of the MACSE software (Ranwez et al., 2011) The *exportAlignment* subprogram was then used to replace stop codons and frameshifts with NNN. The final codon sequences were translated into amino acids with AliView (Larsson, 2014). Phylogenetic relationships were reconstructed using IQ-TREE (Nguyen et al., 2015), with the best substitution model estimated by ModelTest-NG (Darriba, 2020) based on AIC scores. Branch supports were estimated with 1,000 ultrafast bootstrap replicates. The canonical sequence of *MarinerL-1_AO* was added as an outgroup.

The phylogenetic relationships of nuclear genomes were reconstructed using the set of orthologous genes annotated by BUSCO in the previous section,

including the reference genome of *Fusarium falciforme*. Nucleotide sequences were aligned with MUSCLE (Edgar 2004), trimmed with trimAl (Capella-Gutiérrez 2009) and concatenated into a supermatrix with the BUSCO Phylogenomics pipeline (https://github.com/jamiemcg/BUSCO_phylogenomics). IQ-TREE was then run with the same parameters as described above.

*Abundance analysis*

Forward short-reads of high throughput whole genome sequencing were retrieved from the Sequence Read Archive (SRA) of NCBI (see accession nos. in Table S1) for those species with positive hits for *hupfer*. Raw reads were quality filtered and had their adapters removed with fastp (Chen et al., 2018). Resulting reads were downsampled to a depth of ~10X (considering a mean genome size of 20 megabases). The data was then input in RepeatProfiler (Negm et al., 2020) to map reads against the canonical *hupfer* sequence. Additionally, 10 single-copy genes were randomly chosen from the set of genes used in the phylogenetic analysis and were included for read normalization across samples.

*Inference of horizontal transfer events*

To infer horizontal transfer events, an analysis was performed using the VHICA software (Wallau et al., 2016). The methodology involved a codon alignment of the TPase sequence, following what was done in the phylogenetic analysis. 30 single-copy orthologous genes were randomly selected from the results obtained with the BUSCO software, which allows a representative sample of conserved nuclear genes. The nuclear tree was used as input in VHICA,

together with the codon alignments of TPase and the 30 individual genes. VHICA performed an analysis of the synonymous divergence rate (ω) between the different lineages, which makes it possible to reveal horizontal transfer based on atypical divergence patterns.

## Results and discussion

*Distribution of hupfer across genomes of Cordycipitaceae*

Research into the sequences of the *hupfer* element in the genomes of the *Cordycipitaceae* family revealed the presence of two main genera: *Beauveria* and *Cordyceps*. Of the 12 genera with their genomes deposited in NCBI by May 2025, the element was detected in strains from six species of *Beauveria* (*B. australis*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. pseudobassiana* and *B. varroae*) and two of *Cordyceps* (*C. cateniannulata* and *C. farinosa*), as detailed in table S1. These findings suggest that there may be an uneven distribution of the *hupfer* and that it may have a preferential distribution among some taxa and have an importance in the genomic context of preserving these elements.

A total of 419 genomes of fungi of the genera *Beauveria* and *Cordyceps* were analyzed to identify the presence of the *hupfer* gene. Of this total, 100 genomes (23.9%) had the gene. When analyzed separately by genus, the results were as follows: In *Beauveria*, the hupfer gene was detected in 98 of the 354 genomes analyzed, corresponding to 27.7% of the total strains of this genus (Table S1). In *Cordyceps*, the presence of the gene was much less frequent: only 2 of the 65 strains had *hupfer*, representing 3.1% of the total (Table S2).

*Phylogenetic relationships and abundance of hupfer copies*

The phylogenetic analyses were carried out with the gene encoding the *hupfer* transposase (TPase) and generated a final alignment of 840 bp (280 amino acid residues) (Figure 1). The groupings revealed clusters inconsistent with the phylogenies of the host species, showing that there is the presence of horizontal transposon transfer (HTT) events for the evolution of the *hupfer* transposase, as well as ensuring good statistical support (p-values < 0.01). This shows that high similarity between *hupfer* copies of evolutionarily distant species reinforces this hypothesis, as discussed by Souza et al. (2020) and Feschotte & Pritham (2007).

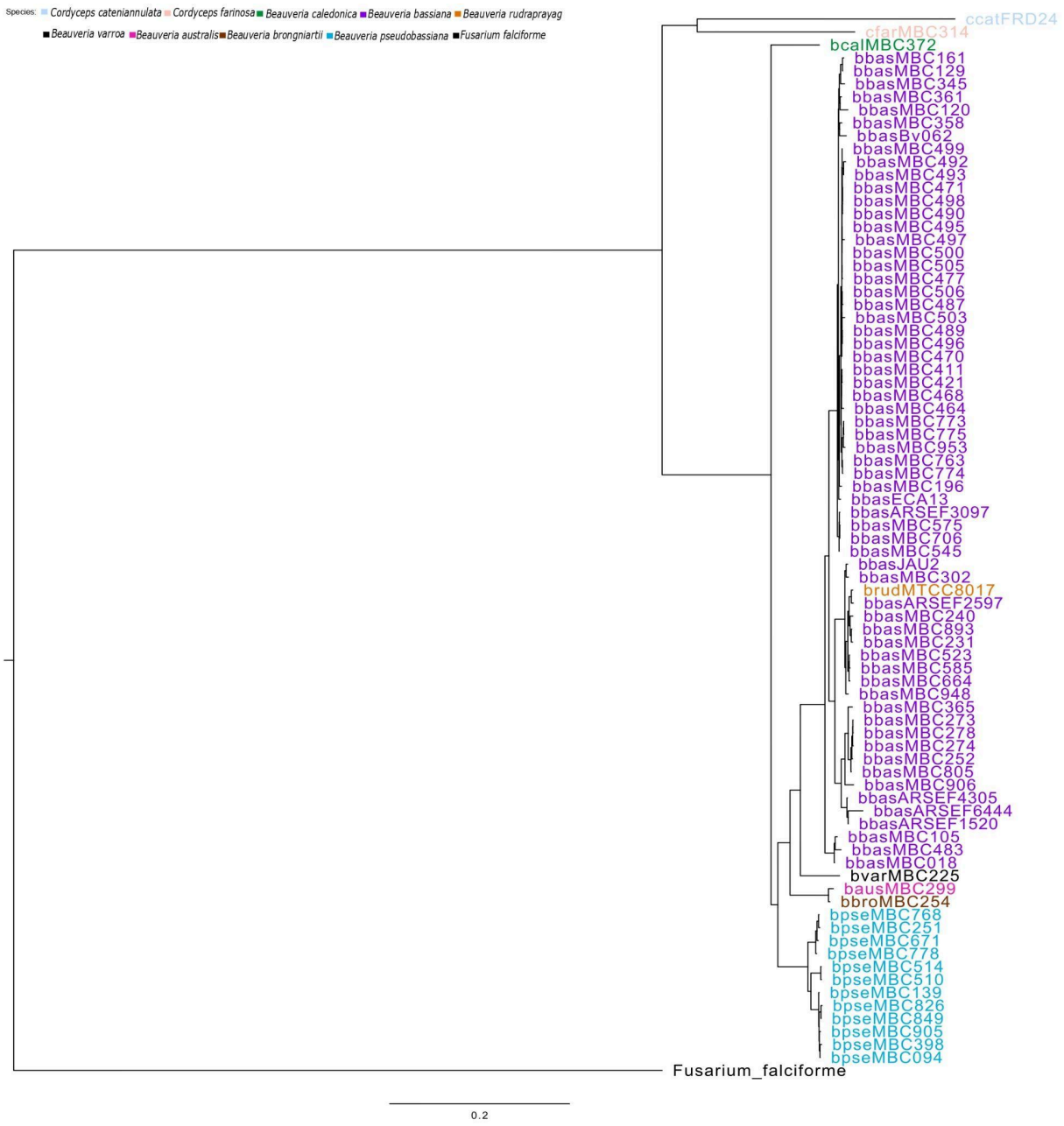



Figure 1: Phylogenetic relationships between host genomes. The phylogenetic tree represents the evolutionary relationships between the fungal lineages analyzed, inferred on the basis of nuclear genomic sequences. Each OTU corresponds to a strain, and the different colors indicate different species. Color: Light blue: *Beauveria pseudobassiana*; Dark green: *Beauveria caledonica*; Purple: *Beauveria bassiana*; Orange/Light brown: *Beauveria rudraprayag*; Black: *Fusarium falciforme* and *Beauveria varroa*; Pink: *Beauveria australis*; Brown: *Beauveria brongniartii*.

Phylogenetic analysis showed that all strains of *Beauveria pseudobassiana* make up a well-supported monophyletic clade (bootstrap = 100), while *B. rudraprayag* was grouped with *B. bassiana*, showing an unusual evolutionary relationship (figure 1). This grouping may be the result of ancestral hybridization or introgression events, as has been proposed in other studies (Muszewska et al., 2019). The clear evidence of clade separation indicates both intra- and interspecific genetic diversity, indicating that ecological and geographical factors play an important role in this dynamic. The preservation of the transposase domain (280 aa) and the variability of the non-coding regions shows that *hupfer* remains with its primitive function, but undergoes local adaptive modifications. The presence of genomic regions with multiple copies of the element in association with regions rich in elements with repeats suggests the role of insertion hotspots and possible active recombination mechanisms (Kempken & Windhofer, 2001). These results reinforce the importance of the idea that transposons are important evolutionary forces (Biémont & Vieira, 2006).

Phylogenetic analysis showed that all strains of Beauveria pseudobassiana make up a well-supported monophyletic clade (bootstrap = 100), while B. rudraprayag was grouped with B. bassiana, showing an unusual evolutionary relationship (Fig.2). This grouping may be the result of ancestral hybridization or introgression events, as has been proposed in other studies (Muszewska et al., 2019). The clear evidence of clade separation indicates both intra- and interspecific genetic diversity, indicating that ecological and geographical factors play an important role in this dynamic.

This shows that the elements could be involved in controlling gene expression, influencing the phenotypic plasticity and ecological adaptation of these entomopathogenic fungi (Casacuberta & González, 2013).

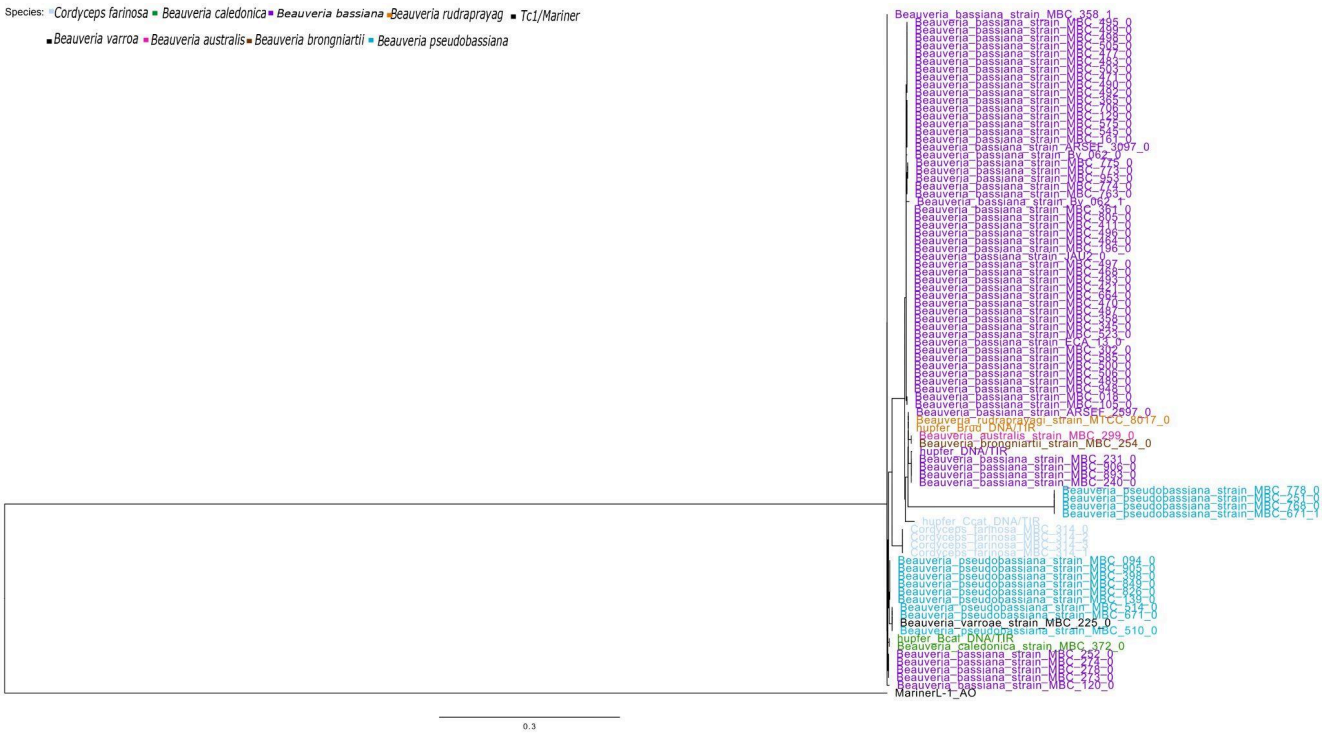



Figure 2: Phylogenetic tree inferred using the maximum likelihood method. The dendrogram represents the evolutionary relationship between the sequences analyzed, with statistical support indicated on the branches. The colors of the labels identify different taxonomic groups or experimental conditions. The scale at the bottom indicates the number of nucleotide substitutions per position.Cyan: Cordyceps farinosa. Color: Light blue: *Beauveria pseudobassiana;* Dark green: *Beauveria caledonica*; Purple: *Beauveria bassiana*; Orange/Light brown: *Beauveria rudraprayag*; Black: Tc1/Mariner and *Beauveria varroa*; Pink: *Beauveria australis*; Brown: *Beauveria brongniartii*.

Statistically significant HTT was observed between ($P < 0.01$) with the color intensity and the strength of the support (P) (fig 3). These groupings may reflect probable common origins and suggest that the dynamics of transposons in

the Cordycipitaceae family is complex and that they are subject to selective pressures and horizontal transfer events.

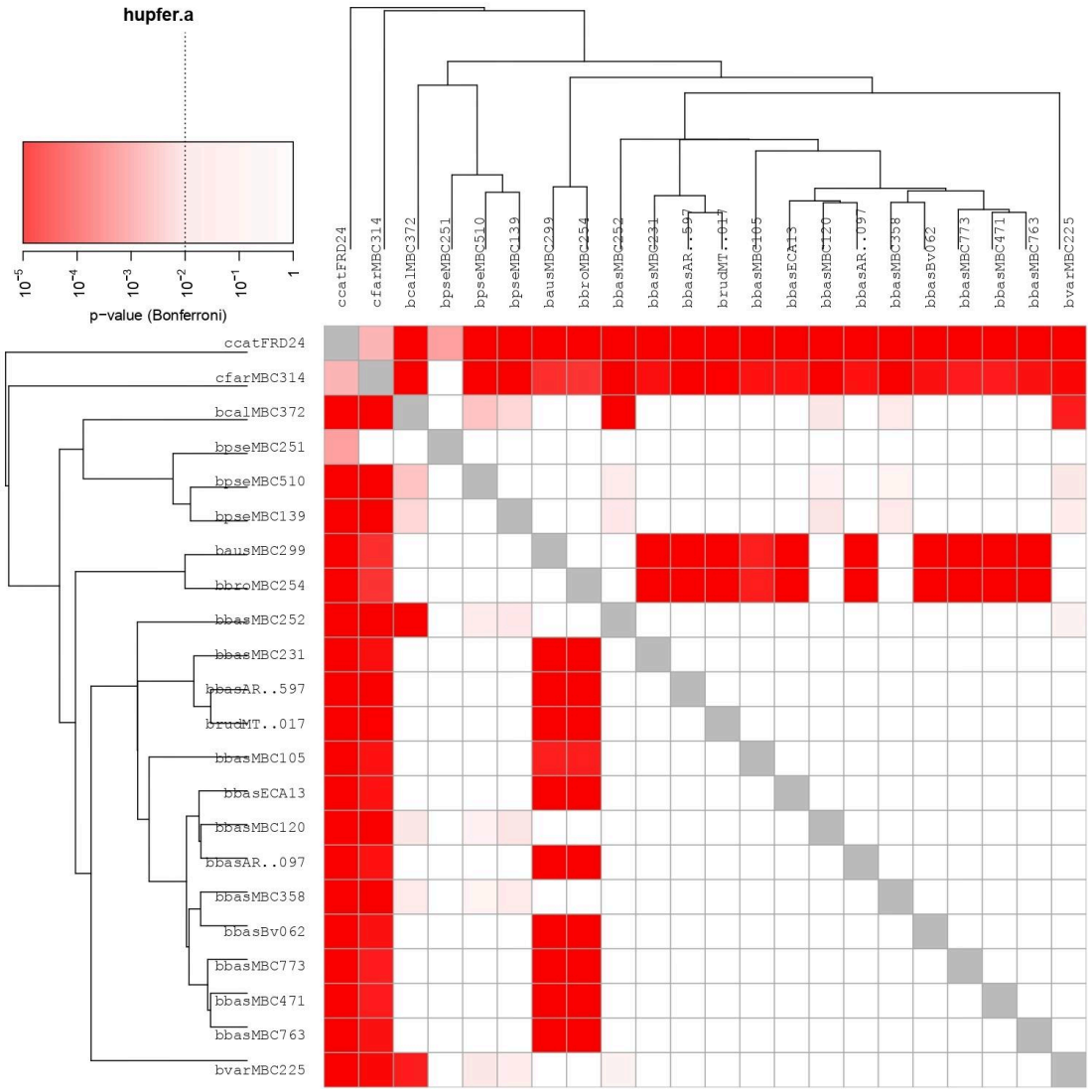



Figure 3. Heatmap of statistical significance with hierarchical clustering. The heatmap represents the p-values adjusted by the Bonferroni method for multiple comparisons between the samples/groups indicated on the axes. The color gradient indicates the degree of statistical significance: deep red represents highly significant comparisons ($p < 10^{-5}$), while lighter shades indicate progressively less significant values. White cells indicate non-significant comparisons,

and gray cells correspond to the main diagonal (self-comparisons) or missing data. The hierarchical clustering tree (dendrogram) organizes the samples based on statistical similarity.

The depth plots (depth 4-6) showed different coverage patterns between the B. bassiana strains, with variations between the high, intermediate and low depth regions (Fig 4). For example, strain ARSEF 2597 showed consistently high depth regions (red and yellow), perhaps indicating areas of possible amplification or repetitive hupfer presence. Other strains, for example B. bassiana ECA 13 and MBC 120, exhibited alternating patterns of depth, strengthening the hypothesis of targeted insertions.

Finally, this study demonstrates that the distribution and characterization of hupfer elements in the genomes of the Cordycipitaceae family not only provide evidence of mobility and evolution, but also reveal a possible functional role in genomic diversity and environmental adaptation of fungi. The identification of HTTs, phylogenetic variations and insertions adjacent to functional genes reinforces the idea that transposons act as active elements in genome architecture and evolution.

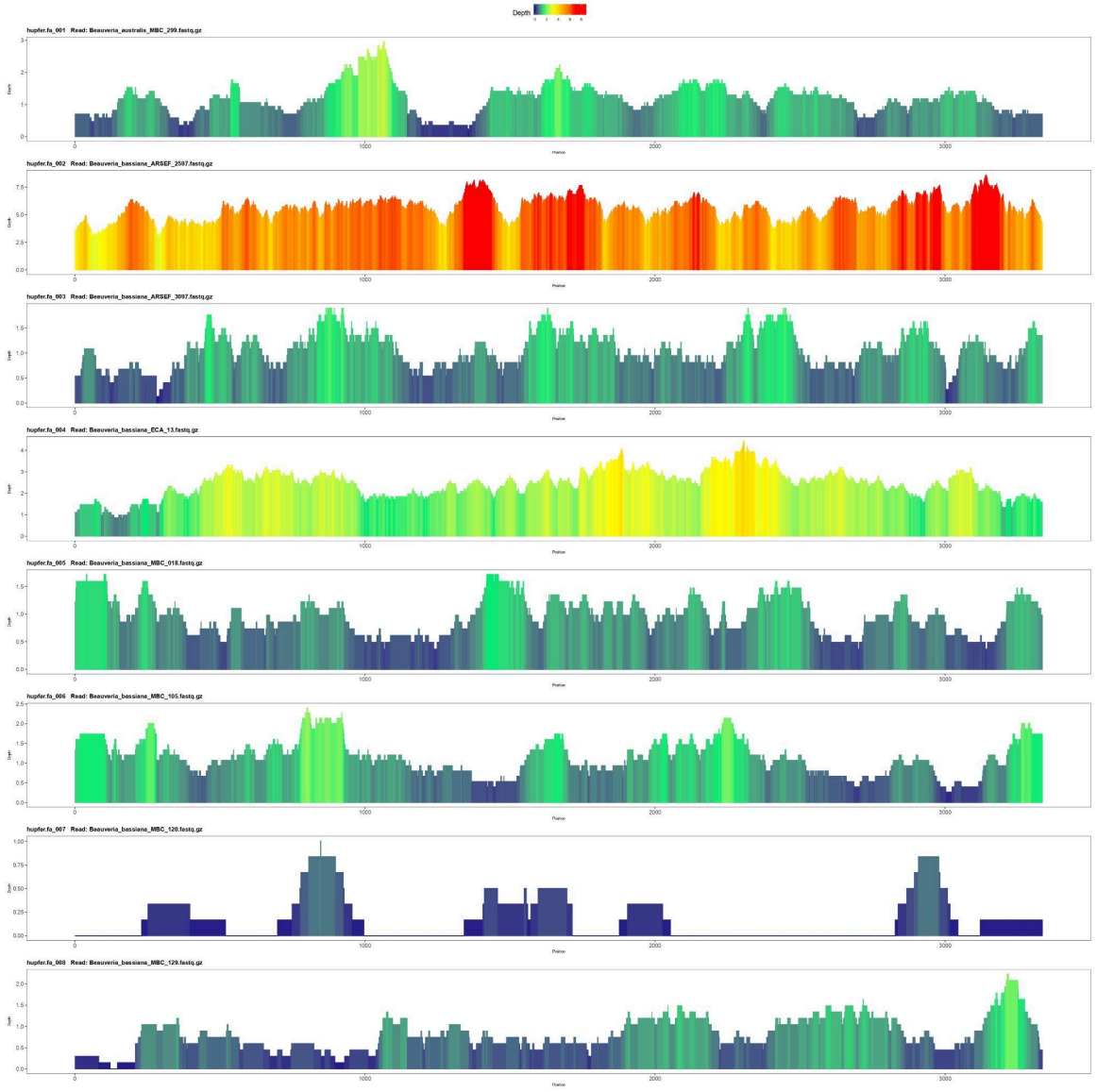



Figure 4. Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Acknowledgments**

The authors would like to thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

**Conflict of Interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

**Authors contribution**

CCS: Managed the project. MLB, CCS: Wrote the manuscript. MLB: Conducted experiments, validation, data curation, formal analysis, and visualization. HRMA: Provided software, methodology, and resources. CCS, HRMA: Performed bioinformatics analyses.

**References**

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.

Biedler J and Tu Z (2003) Non-LTR retrotransposons in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: unprecedented diversity and evidence of recent activity. *Mol Biol* Evol 20:1811–1825.

Biemont C and Vieira C (2006) Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443(7111):521–524.

Bourque G, Burns KH, Gehring M, Gorbunova V, Seluanov A, Hammell M, Imbeault M, Izsvák Z, Levin HL, et al. (2018) Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol* 19(1):199.

Brown PO, Bowerman B, Varmus HE and Bishop JM (1987) Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49:347–356.

Casacuberta E and González J (2013) The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol Ecol* 22(6):1503–1517.

Chen S, Zhou Y, Chen Y and Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34(17):i884–i890.

Cornec A and Poirier EZ (2023) Interplay between RNA interference and transposable elements in *mammals*. *Front Immunol* 2023.

Daboussi M and Capy P (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 57:275–299.

Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B and Flouri T (2020) ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol Biol Evol* 37(1):291–294.

Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5:103–107.

Feschotte C and Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of *eukaryotic* genomes. *Annu Rev Genet* 41:331–368.

Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O and Jurka MV (2007) Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8:241–259.

Kempken F and Windhofer F (2001) The hAT family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. *Chromosoma* 110(1):1–9.

Kidwell MG (1992) Horizontal transfer. Curr Opin Genet Dev 2(6):868–873.

Larsson A (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30(22):3276–3278.

Manni M, Berkeley MR, Seppey M, Simão FA and Zdobnov EM (2021) BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. *Mol Biol Evol* 38(5):4647–4654.

Maurer P, Rejasse A, Capy P, Langin T and Riba G (1997) Isolation of the transposable element hupfer from the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana by insertion mutagenesis of the nitrate reductase structural gene. *Genetics* 256(2):195–202.

Muszewska A, Steczkiewicz K and Grynberg M (2019) Transposable elements contribute to fungal genes and impact fungal lifestyle. *Sci Rep* 9(1):4307.

Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A and Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32(1):268–274.

Ranwez V, Harispe S, Delsuc F and Douzery EJP (2011) MACSE: Multiple alignment of coding sequences accounting for frameshifts and stop codons. *PLoS ONE* 6(9):e22594.

Smit AFA, Hubley R and Green P (2015) RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015.

Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B and Spatafora JW (2007) Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57:5–59.

The TE Hub Consortium, Elliott TA, Heitkam T, Hubley R, Quesneville H, Suh A, Wheeler TJ, et al. (2023) TE Hub: A community-oriented space for sharing and connecting tools, data, resources, and methods for transposable element annotation.

Wallau GL, Capy P, Loreto E, Le Rouzic A and Hua-Van A (2016) VHICA, a new method to discriminate between vertical and horizontal transposon transfer: application to the Mariner family within Drosophila. *Genome Biol Evol* 8(3):557–568.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, et al. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8(12):973–982.

**Internet resources**

Smit A, Hubley R, Green P. RepeatMasker 4.0. 2024. [16 de agosto de 2024] <http://www.repeatmasker.org>

**Supplementary material**

**Table S1 –** List of *Beauveria* (*Cordycipitaceae*) strains included in this study, showing Blastn results for hupfer gene homologs and corresponding NCBI SRA accessions for short-read sequencing data.

**Table S2 –** List of *Cordyceps* (*Cordycipitaceae*) strains included in this study, showing Blastn results for hupfer gene homologs and corresponding NCBI SRA accessions for short-read sequencing data.

**Supplementary files legends:**

**Supplementary Figure S1:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S2:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of

greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S3:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S4:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S5:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of

greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S6:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S7:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S8:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of

greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Supplementary Figure S9:** Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

**Table S1. List and taxonomy of *Beauveria* species included in this study, indicating strain codes, number of retrieved sequences, and corresponding SRA accession numbers when available.**

| Genus | Species | Strain | N sequences | SRA |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *asiatica* | ARSEF4384 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC623 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC631 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC638 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC657 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC659 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC677 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC679 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC680 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC682 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC686 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC687 | 0 | |
| *Beauveria* | *asiatica* | MBC705 | 0 | |
| *Beauveria* | *australis* | MBC212 | 0 | |
| *Beauveria* | *australis* | MBC287 | 0 | |
| *Beauveria* | *australis* | MBC299 | 0 | |
| *Beauveria* | *australis* | MBC340 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF2860 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | D1.5 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF1520 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF2597 | 1 | SRR3269550 |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF3097 | 1 | SRR11521919 |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF4305 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF5078 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF6444 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ARSEF8028 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | BCC2660 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | Bv062 | 1 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA0 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA01 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA13 | 1 | SRR12774118 |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA26 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA27 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA31 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA43 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ECA44 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | ERL836 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | HN6 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | JAU2 | 1 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *bassiana* | JEF007 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | JEF350 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | KNU.101 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC013 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC018 | 1 | SRR22002000 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC034 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC035 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC037 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC040 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC042 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC047 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC048 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC051 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC105 | 1 | SRR22001994 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC106 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC120 | 1 | SRR22001986 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC127 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC129 | 1 | SRR22001983 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC130 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC135 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC147 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC148 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC161 | 1 | SRR22001972 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC179 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC196 | 1 | SRR22001966 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC197 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC200 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC215 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC220 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC222 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC223 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC226 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC229 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC231 | 1 | SRR22001950 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC232 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC233 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC240 | 1 | SRR22001944 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC244 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC245 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC252 | 1 | SRR22001935 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC253 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC255 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC256 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC258 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC260 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC264 | 0 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC268 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC270 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC273 | 1 | SRR22001920 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC274 | 1 | SRR22001919 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC278 | 1 | SRR22001918 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC279 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC281 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC282 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC283 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC291 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC295 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC297 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC302 | 1 | SRR22217177 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC306 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC308 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC319 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC322 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC324 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC326 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC345 | 1 | SRR22217148 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC352 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC358 | 2 | SRR22217142 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC361 | 1 | SRR22217115 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC365 | 1 | SRR22217113 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC377 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC379 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC382 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC408 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC411 | 1 | SRR22217099 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC413 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC416 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC417 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC418 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC421 | 1 | SRR22217093 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC435 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC445 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC448 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC454 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC457 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC459 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC464 | 1 | SRR22217078 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC468 | 1 | SRR22217077 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC470 | 1 | SRR22217076 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC471 | 1 | SRR22217075 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC477 | 1 | SRR22217074 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC483 | 1 | SRR22217071 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC487 | 1 | SRR22217070 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC488 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC489 | 1 | SRR22217068 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC490 | 1 | SRR22217067 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC492 | 1 | SRR22217066 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC493 | 1 | SRR22217065 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC495 | 1 | SRR22217064 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC496 | 1 | SRR22217063 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC497 | 1 | SRR22217061 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC498 | 1 | SRR22217060 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC499 | 1 | SRR22217059 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC500 | 1 | SRR22217058 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC503 | 1 | SRR22217057 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC505 | 1 | SRR22217056 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC506 | 1 | SRR22217055 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC517 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC523 | 1 | SRR22217132 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC539 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC545 | 1 | SRR22217124 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC574 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC575 | 1 | SRR22217168 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC578 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC582 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC585 | 1 | SRR22217159 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC589 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC590 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC597 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC606 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC617 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC618 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC649 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC652 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC664 | 1 | SRR22217252 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC670 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC681 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC693 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC706 | 1 | SRR22217223 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC713 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC715 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC719 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC722 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC725 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC726 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC736 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC742 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC743 | 0 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC751 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC763 | 1 | SRR22217291 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC765 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC769 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC773 | 1 | SRR22217358 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC774 | 1 | SRR22217357 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC775 | 1 | SRR22217356 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC780 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC781 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC785 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC794 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC800 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC805 | 1 | SRR22217347 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC827 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC834 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC836 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC841 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC843 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC854 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC855 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC858 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC864 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC873 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC878 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC882 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC887 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC893 | 1 | SRR22217381 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC898 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC899 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC904 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC906 | 1 | SRR22217372 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC907 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC910 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC938 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC948 | 1 | SRR22217284 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC951 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC953 | 1 | SRR22217279 |
| *Beauveria* | *bassiana* | MBC970 | 0 | |
| *Beauveria* | *bassiana* | QB028 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | 3172 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC254 | 1 | SRR22001933 |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC397 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC630 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC641 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC647 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC655 | 0 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC662 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC663 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC665 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC667 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC668 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC674 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC696 | 0 | |
| *Beauveria* | *brongniartii* | MBC699 | 0 | |
| *Beauveria* | *caledonica* | MBC372 | 1 | SRR22217112 |
| *Beauveria* | *felina* | SYSUMS7908 | 0 | |
| *Beauveria* | *medogensis* | MBC320 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | KACC47484 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC045 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC094 | 1 | SRR22001997 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC107 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC113 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC117 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC139 | 1 | SRR22001979 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC145 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC158 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC166 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC192 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC211 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC213 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC214 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC224 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC227 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC242 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC246 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC249 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC251 | 1 | SRR22001936 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC271 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC280 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC284 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC292 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC298 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC304 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC381 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC398 | 1 | SRR22217104 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC405 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC431 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC447 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC510 | 1 | SRR22217140 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC514 | 1 | SRR22217137 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC538 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC570 | 0 | |

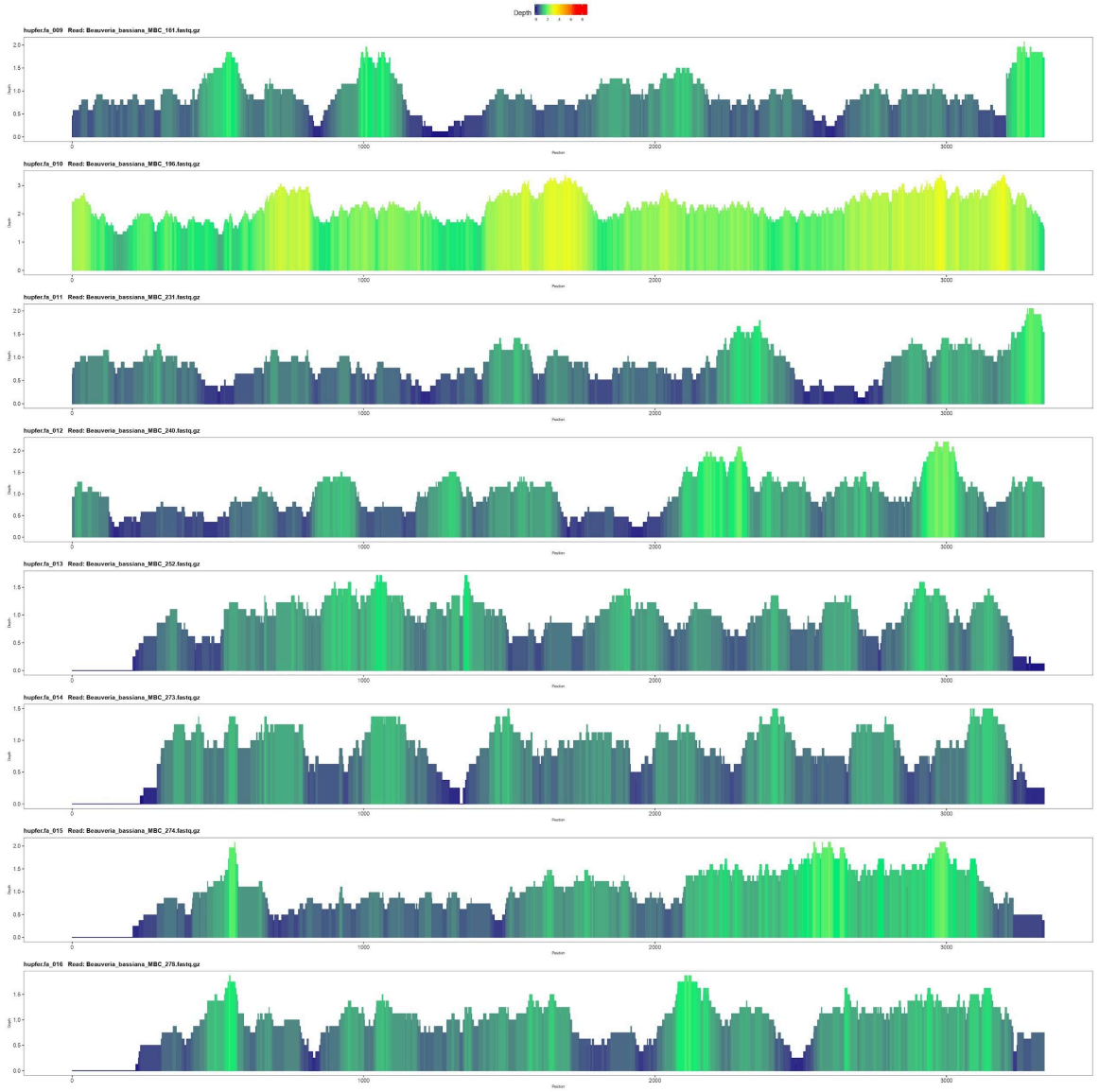
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC596 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC598 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC600 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC604 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC605 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC607 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC614 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC615 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC616 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC669 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC671 | 1 | SRR22217245 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC712 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC744 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC756 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC761 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC766 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC768 | 1 | SRR22217288 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC778 | 0 | SRR22217355 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC789 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC803 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC810 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC823 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC826 | 1 | SRR22217342 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC833 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC835 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC844 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC846 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC849 | 1 | SRR22217329 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC856 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC863 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC867 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC870 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC871 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC886 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC888 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC892 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC897 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC900 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC905 | 1 | SRR22217373 |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC909 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC918 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC926 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC931 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC940 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC944 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC949 | 0 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC952 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC959 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC962 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC963 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC964 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | MBC978 | 0 | |
| *Beauveria* | *pseudobassiana* | RGM2184 | 0 | |
| *Beauveria* | *rudraprayagi* | MTCC8017 | 1 | |
| *Beauveria* | *scarabaeidicola* | ARSEF5689 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC225 | 1 | SRR22001954 |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC261 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC285 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC356 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC422 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC479 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC525 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC714 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC728 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC753 | 0 | |
| *Beauveria* | *varroae* | MBC880 | 0 | |

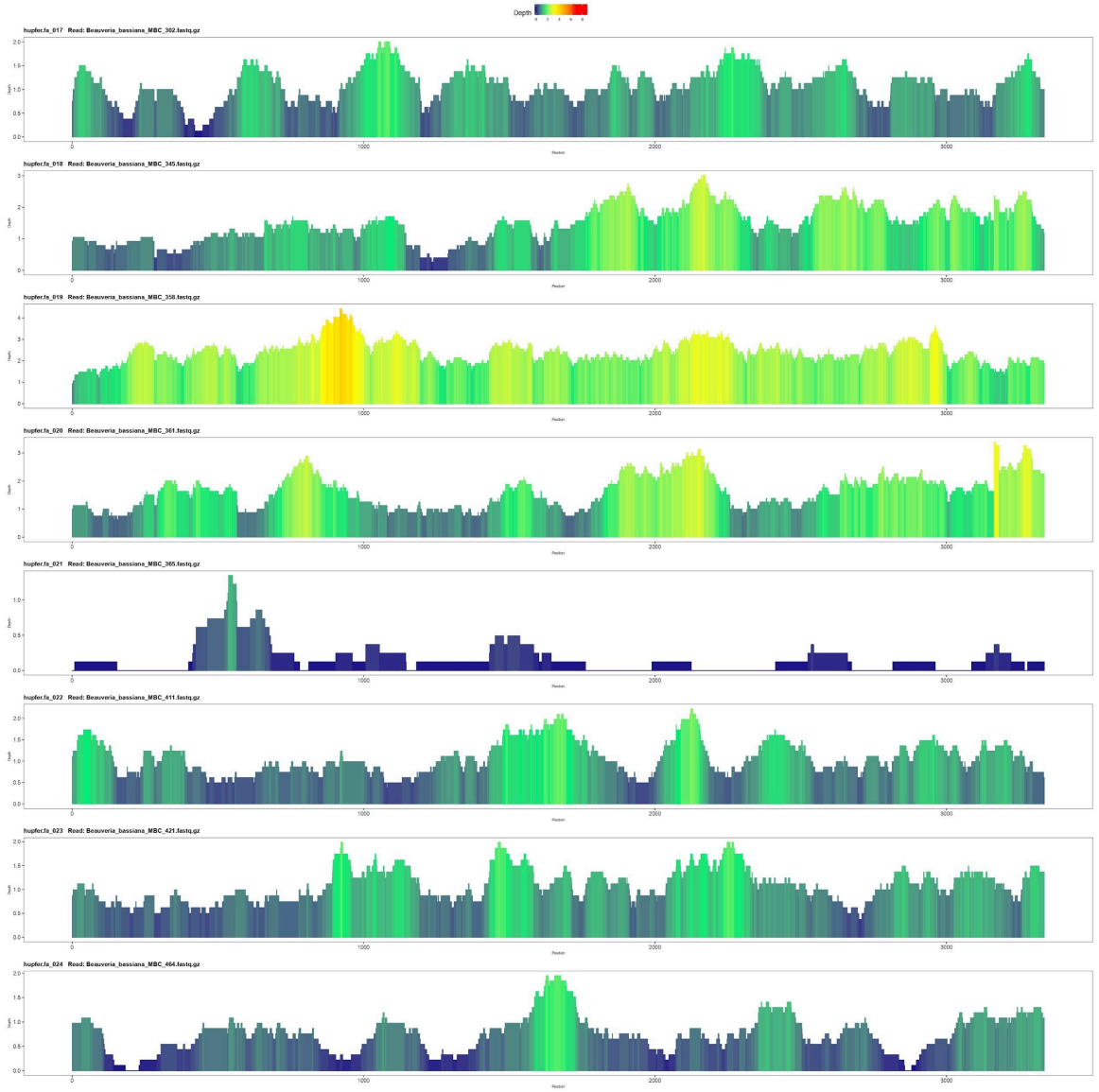
**Table S2. List and taxonomy of Cordyceps species included in this study, indicating strain codes, number of retrieved sequences, and corresponding SRA accession numbers when available.**

| Genus | Specie | Strain | N sequences | SRA |
|---|---|---|---|---|
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | FRD24 | 1 | |
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | MBC234 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | MBC247 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | MBC771 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | MBC895 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cateniannulata* | MBC950 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cicadae* | BA001 | 0 | |
| *Cordyceps* | *cicadae* | CC02CCAD | 0 | |
| *Cordyceps* | *cicadae* | ZJ1611 | 0 | |
| *Cordyceps* | *farinosa* | KACC47486 | 0 | |
| *Cordyceps* | *farinosa* | MBC314 | 4 | SRR22217095 |
| *Cordyceps* | *farinosa* | MBC401 | 0 | |
| *Cordyceps* | *farinosa* | MBC692 | 0 | |
| *Cordyceps* | *farinosa* | MBC733 | 0 | |
| *Cordyceps* | *farinosa* | MTCC4114 | 0 | |
| *Cordyceps* | *fumosorosea* | ARSEF2679 | 0 | |

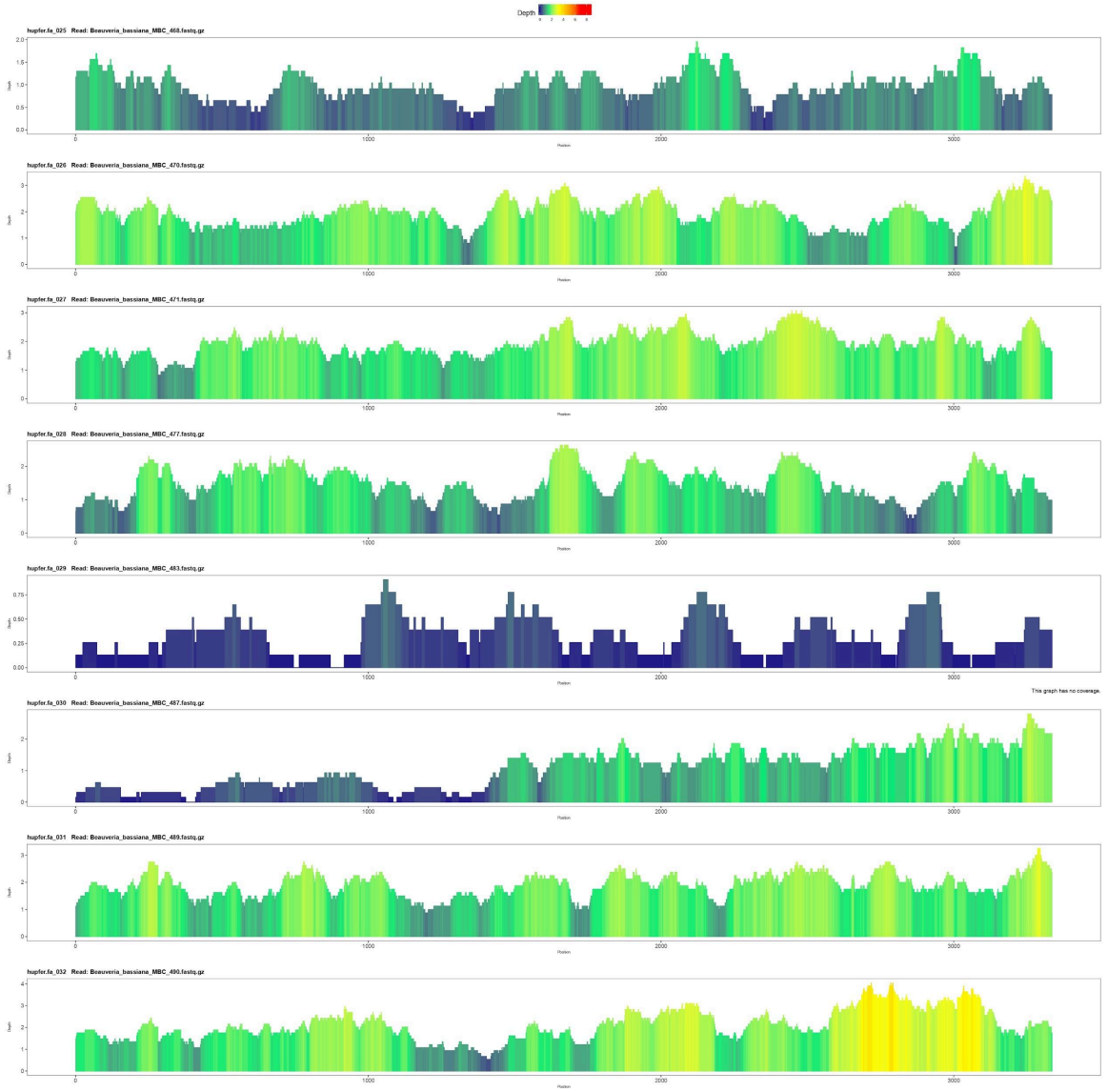
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Cordyceps* | *javanica* | F084 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | IJ1G | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | IJ2G | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC323 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC336 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC348 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC349 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC360 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC375 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC509 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC512 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC515 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC516 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC518 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC533 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC544 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC550 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC551 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC552 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC560 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC566 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC567 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC571 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC573 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC576 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC577 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC579 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC580 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC583 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC588 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC625 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC633 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC636 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC721 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC739 | 0 | |
| *Cordyceps* | *javanica* | MBC814 | 0 | |
| *Cordyceps* | *militaris* | 1 | 0 | |
| *Cordyceps* | *militaris* | ATCC34164 | 0 | |
| *Cordyceps* | *militaris* | CM01 | 0 | |
| *Cordyceps* | *pruinosa* | KACC44470 | 0 | |
| *Cordyceps* | *tenuipes* | KACC47485. | 0 | |
| *Cordyceps* | *tenuipes* | YF17002 | 0 | |



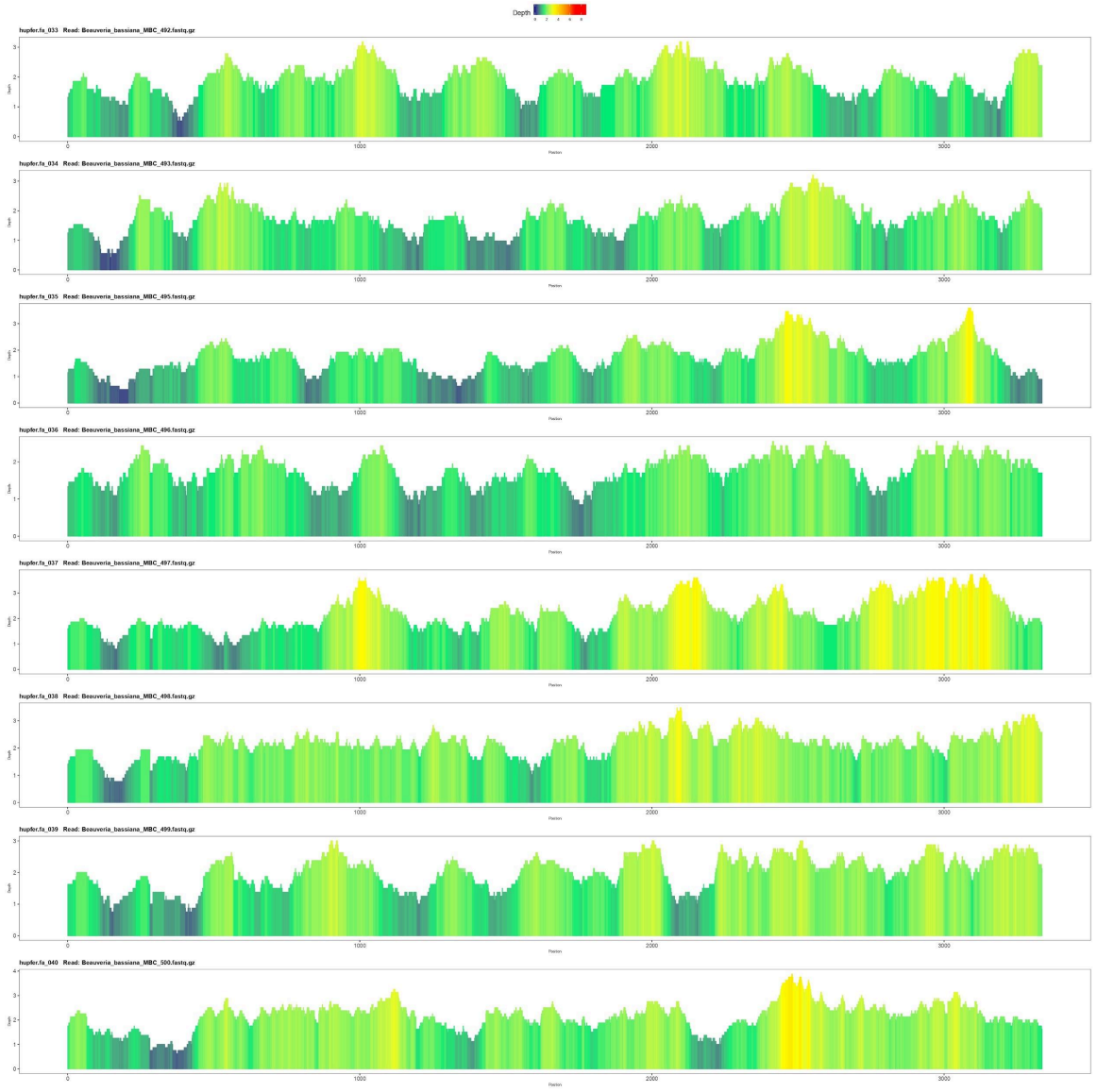

**Supplementary Figure S1:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.



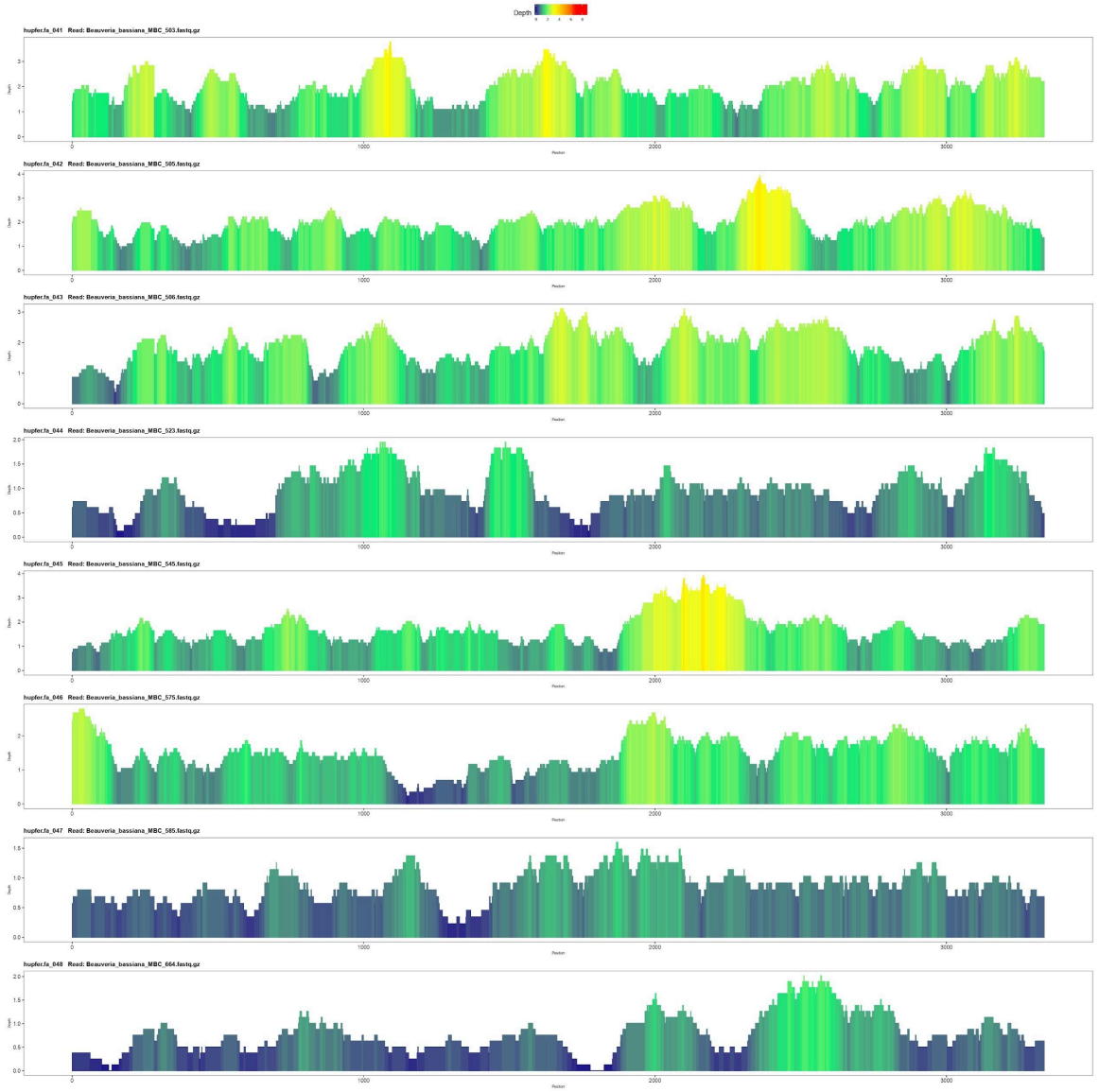

**Supplementary Figure S2:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.



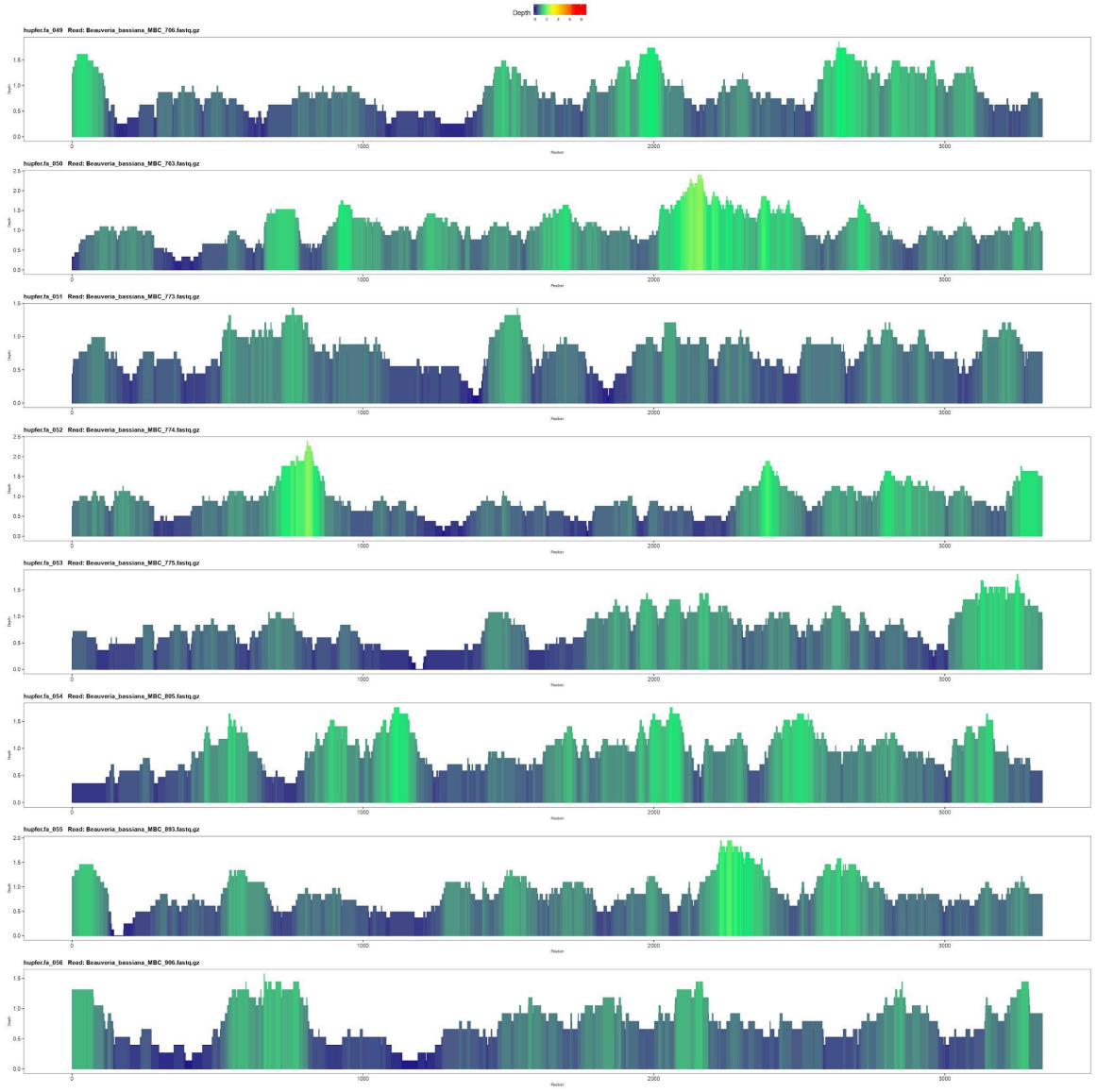

**Supplementary Figure S3:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.



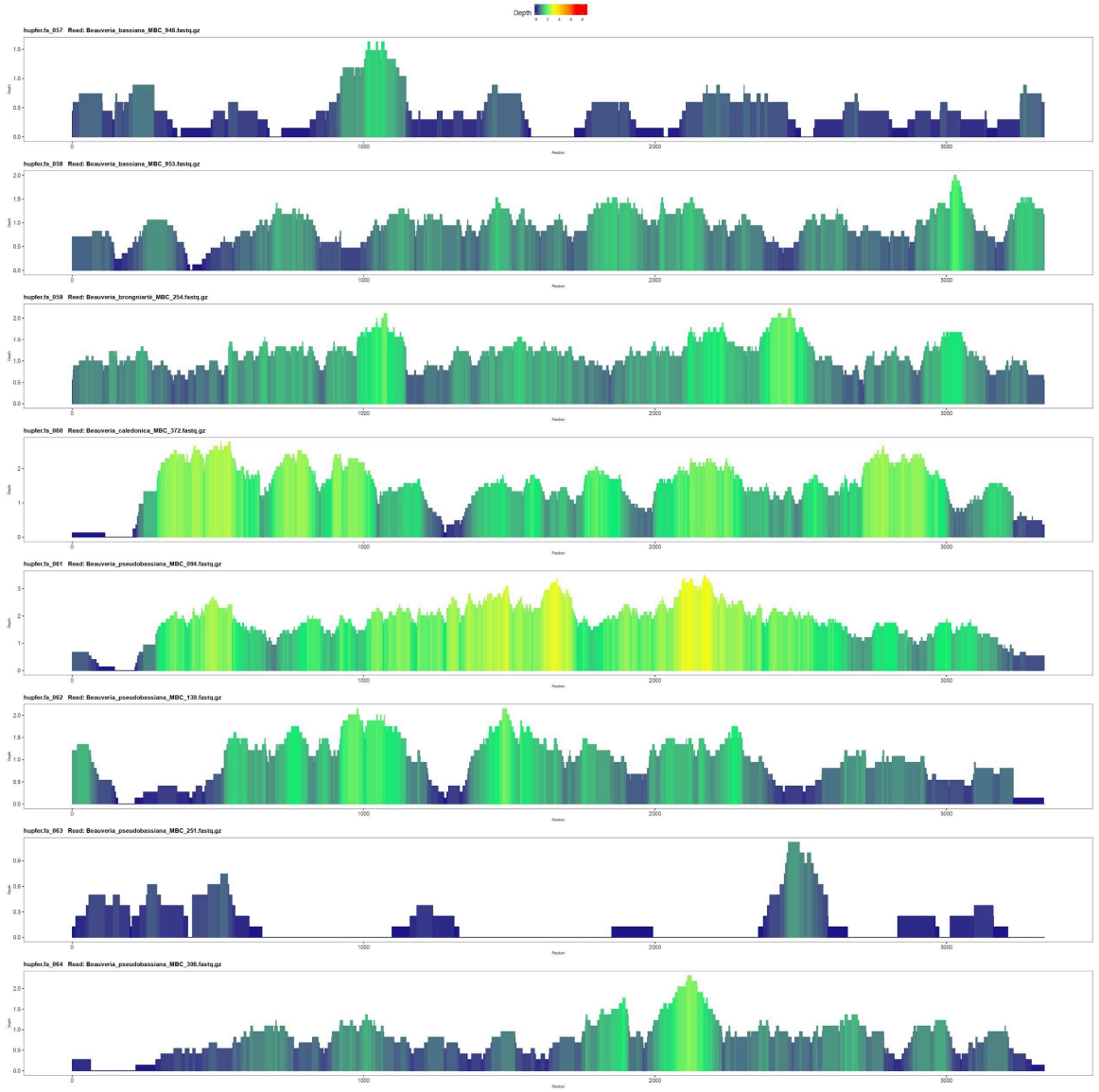

**Supplementary Figure S4:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.



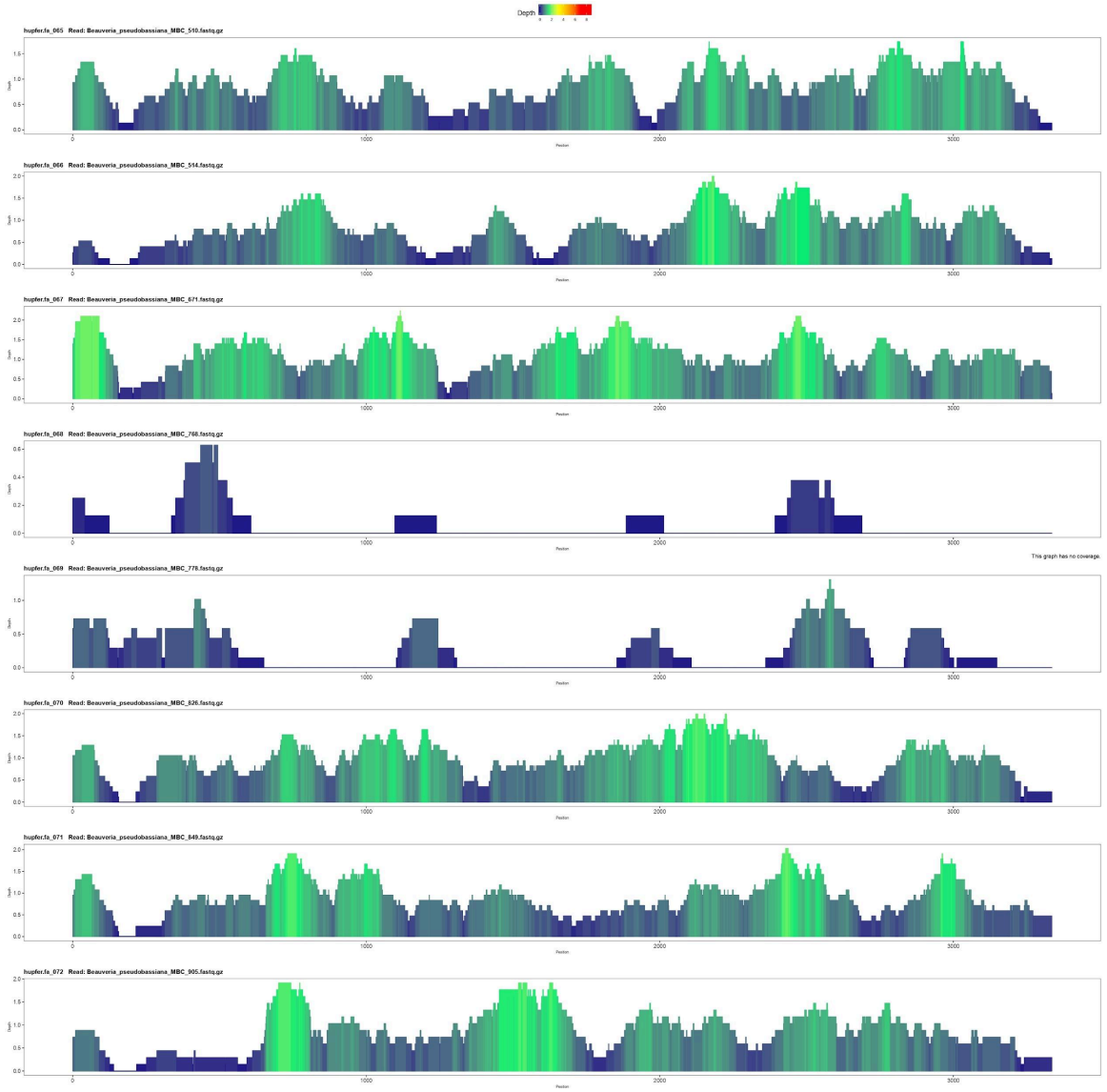

**Supplementary Figure S5:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.



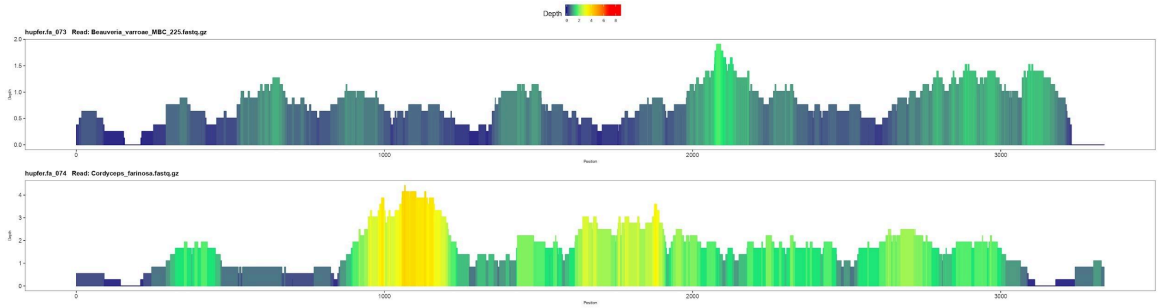

**Supplementary Figure S6:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.




**Supplementary Figure S7:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.




**Supplementary Figure S8:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.




**Supplementary Figure S9:**Heatmap of depth distribution along genomic position. The heatmap displays the depth of coverage in different genomic regions for multiple samples. The color scale represents the intensity of the depth: bluish tones indicate low coverage, while greenish, yellow and red tones reflect progressively higher coverage. Variation in depth can indicate regions of greater or lesser biological interest, the presence of duplications, deletions or sequencing artifacts.

## 4.DISCUSSÃO GERAL

O gênero *Beauveria* destaca-se como um dos fungos de maior importância quando se fala de controle biológico de pragas agrícolas em escala global, tendo uma notável flexibilidade ecológica e uma capacidade de adaptação a diversos ecossistemas (SANTHOSH et al., 2025). O uso de manipulação genética através de *B. bassiana* tem se mostrado uma ferramenta importantíssima para o aprimoramento de características tecnológicas, facilitando o desenvolvimento de linhagens recombinantes sendo eficazes no controle biológico de insetos prejudiciais na agricultura (MASCARIN et al., 2025). Diante desse contexto, a aplicação de um sistema de transformação genética com eficiência e segurança se torna um avanço valioso na engenharia genética de fungos promovendo não apenas a introdução de genes de interesse, como também vias metabólicas presentes na patogenicidade.

Diante da necessidade de sistemas de seleção eficientes, o marcador *SUR1* surge como uma ferramenta de alto potencial para a transformação genética em fungos, principalmente os fungos entomopatogênicos. Este sistema, organizado na resistência a herbicidas do grupo das sulfoniluréias, é uma alternativa segura ao meio ambiente em relação a marcadores de resistência a antibióticos que carregam uma preocupação de biossegurança e um grande risco ecológico (GOLDSTEIN; THOMAS, 2004; ZHANG et al., 2010). A determinação da concentração inibitória mínima de clorimuron-etil em 10 µg/mL para *B. bassiana* AS272 possibilitou um sistema seletivo desenvolvido e de eficiência, sendo capaz de distinguir de forma notável entre células transformadas e não-transformadas, de acordo com os ensaios de crescimento em meio seletivo.

Os resultados alcançados apresentam que a eficiência da transformação está diretamente relacionada à quantidade de DNA plasmidial, com concentrações na faixa de 5 µg tendo um maior rendimento de colônias transformadas. Este tipo de relação entre quantidade de DNA e eficiência de transformação mostra que processos de integração do material genético exógeno no genoma do fungo são fenômenos limitantes, mas passíveis de

otimização. A confirmação através de PCR da integração do gene *SUR1*, aliada a manutenção da resistência ao herbicida clorimuron-etil em sucessivos cultivos, prova de forma coesa a eficácia e a confiabilidade se um sistema de transformação desenvolvido (ZHANG et al., 2010).

Em paralelo, a investigação aprofundada da ocorrência de distribuição filogenética e padrões evolutivos do elemento transponível *hupfer* em *Cordycipitaceae*, mostra que aspectos importantes da dinâmica genética nestes fungos. A detecção deste elemento transponível em múltiplas espécies de *Beauveria* e *Cordyceps* sugere de maneira significante uma distribuição taxonômica preferencial e a evidência de eventos de transferência horizontal entre linhagens filogeneticamente distantes (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). As análises filogenéticas realizadas apresentaram agrupamentos topologicamente inconsistentes com a filogenia consolidada das espécies hospedeiras, sugerindo fortemente da ocorrência de transferência horizontal como uma ferramenta evolutiva na diversificação e dispersão desses elementos móveis.

A identificação de regiões genômicas contendo múltiplas cópias do elemento transponível *hupfer*, relacionada aos padrões variáveis de profundidade de sequenciamento entre linhagens de *B. bassiana*, indicando a existência de *hotspots* de inserção preferenciais e habilitados mecanismos de amplificação ativa (KEMPKEN; WINDHOFER, 2001). Essa flexibilidade genética, orientada por elementos transponíveis, configura uma importante força evolutiva na adaptação e diversificação fúngica (BIÉMONT; VIEIRA, 2006). A conservação do domínio catalítico da transposase (280 aa) entre as linhagens investigadas aponta uma funcionalidade bioquímica conservada na medida que as variações nas regiões regulatórias não codificantes apontando adaptações específicas dependentes da linhagem.

A integração sinergética destas duas pesquisas complementares, proporciona uma visão completa e multidimensional da genética dos fungos. O sucesso evidente da transformação genética com o marcador *SUR1* (Capítulo I) traz perspectivas para a manipulação dirigida de genes envolvidos na produção de metabólitos de interesse biotecnológico e na virulência. Em conjunto, a compreensão aprofundada dos complexos mecanismos regulatórios que

possuem a dinâmica de elementos transponíveis como o *hupfer* (Capítulo II) fornecendo insights fundamentais sobre a estabilidade genômica e mecanismos elaborados de regulação genética que podem ter influência em estratégias futuras da engenharia genética em fungos entomopatogênicos.

## 5. CONCLUSÕES

- Obtenção de um marcador de seleção positiva;
- A transformação genética foi bem-sucedida com a inserção do gene *SUR1* no genoma do fungo;
- Obtenção de 4 transformantes;
- Distribuição e caracterização de elementos *hupfer* na família *Cordycipitaceae*.
- Identificação de presença de variações filogenéticas.
- Identificação de HTTs (transferências horizontais de transposon).

## 6. PERSPECTIVAS

- Gerar mutantes duplos usando genes mutantes com maior virulência contra insetos que podem afetar a agricultura;

- Usar CRISPR-Cas9 para mutar o ortólogo do gene *niaD* em *B. bassiana*, o que levará à resistência ao clorato;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AL KOURY, C. et al. Expression analysis of the genes involved in the virulence of Beauveria bassiana. **Agri Gene**, v. 14, p. 100094, dez. 2019.

ALTIERI, M.; NICHOLLS, C. Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. Boca Raton: **CRC Press**, 2018.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521–524, 1 out. 2006.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRADSHAW, C. J. A. et al. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. **Nature Communications**, v. 7, p. 12986, 2016.

BRAS, A. et al. Pesticide resistance in arthropods: Ecology matters too. **Ecology Letters**, v. 25, n. 8, p. 1746–1759, 21 jun. 2022.

BOURQUE, G. et al. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology**, v. 19, n. 1, 19 nov. 2018.

BROWN, P. O. et al. Correct integration of retroviral DNA in vitro. **Cell**, v. 49, n. 3, p. 347–356, maio 1987.

CAVALIERE, V.; LATTANZI, G.; ANDRENACCI, D. Silencing of Euchromatic Transposable Elements as a Consequence of Nuclear Lamina Dysfunction. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 625, 5 mar. 2020.

CHEN, J. et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 3 abr. 2017.

CHUONG, E. B.; ELDE, N. C.; FESCHOTTE, C. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 2, p. 71–86, 21 nov. 2016.

COVE, D. J. Genetic studies of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans. **Biological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 291–327, 1 ago. 1979.

DABOUSSI, M.-J.; CAPY, P. Transposable Elements in Filamentous Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 275–299, out. 2003.

DABOUSSI, M. J. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetica**, v. 100, n. 1-3, p. 253–260, 1997.

DE GROOT, M. J. A. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 839-842, 1998.

DILL, G. M.; CAJACOB, C. A.; PADGETTE, S. R. Glyphosate-resistant crops: Adoption, use, and future considerations. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 326–331, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

FANG, W. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Beauveria bassiana using an herbicide resistance gene as a selection marker. v. 85, n. 1, p. 18–24, 1 jan. 2004.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

FÁVARO, L. C. DE L. et al. The biology and potential for genetic research of transposable elements in filamentous fungi. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 804–813, 2005.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, n. 1, p. 331–368, dez. 2007.

FINCHAM, J. R. Transformation in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 148–170, 1989.

GOLDSTEIN, D. A.; THOMAS, J. A. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. **QJM**, v. 97, n. 11, p. 705–716, 20 out. 2004.

GOUKA, R. J. et al. Cloning of the nitrate - nitrite reductase gene cluster of Penicillium chrysogenum and use of the niaD gene as a homologous selection marker. **Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 189–199, set. 1991.

GREEN, R.; ROGERS, E. J. Transformation of chemically competent E. coli. **Methods in Enzymology**, v. 529, p. 329–336, 2013.

GUO, H. et al. Study on the Characteristics and Mechanism of Inorganic Nitrogen Nutrients Preferential Assimilation by Phaeocystis globosa. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 12, n. 6, p. 989, 13 jun. 2024.

HE, B. et al. Functional Genomics of Aspergillus oryzae: Strategies and Progress. **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 103, 1 abr. 2019.

HE, L. et al. Two dominant selectable markers for genetic manipulation in Neurospora crassa. Applied **Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 8, p. 3327-3342, 2020.

JARDAK, R. et al. Establishment of an in vitro regeneration system and genetic transformation of the Tunisian “Maltese half-blood” (Citrus sinensis): an agro-economically important variety. 3 **Biotech**, v. 10, n. 3, 6 fev. 2020.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 1 fev. 2009.

JIANG, D. et al. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1562–1574, 1 dez. 2013.

KAZAZIAN, H. H. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1626–1632, 12 mar. 2004.

KAPLAN, K. et al. Mind your marker: the effect of common auxotrophic markers on complex traits in yeast. **The FEBS Journal**, 21 fev. 2024.

KHAN, S. et al. Mechanism of Insecticide Resistance in Insects/Pests. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 29, n. 3, p. 2023–2030, 31 mar. 2020.

KEMPKEN, F.; WINDHOFER, F. The hAT family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. **Chromosoma**, v. 110, n. 1, p. 1–9, abr. 2001.

KUCK, U.; HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 51–62, 28 jan. 2010.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LAWSON, H. A.; LIANG, Y.; WANG, T. Transposable elements in mammalian chromatin organization. **Nature Reviews Genetics**, v. 24, n. 10, p. 712–723, 7 jun. 2023.

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Genetically engineering better fungal biopesticides. **Pest Management Science**, v. 74, n. 4, p. 781–789, 14 nov. 2017.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.

LV, J. et al. Isolation and Molecular Identification of Auxotrophic Mutants to Develop a Genetic Manipulation System for the Haloarchaeon Natrinema sp. J7-2. **Archaea**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

LYKOGIANNI, M. et al. Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 795, p. 148625, nov. 2021.

MAGAÑA-ORTÍZ, D. et al. A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. **Fungal Genetics and Biology**, v. 56, p. 9–16, jul. 2013.

MALARDIER, L. et al. Cloning of the nitrate reductase gene (niaD) of Aspergillus nidulans and its use for transformation of Fusarium oxysporum. **Gene**, v. 78, n. 1, p. 147–156, 1989.

MASCARIN, G. M. et al. Enhanced virulence through genetic engineering of Beauveria bassiana blastospores by overexpression of a cuticle-degrading endochitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1313-1322, 2016.

MASCARIN, G. M. et al. Advances in the production and formulation of fungal biopesticides for pest control. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2024.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–53, jul. 2019.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, 15 set. 2016.

MAT RAZALI, N.; CHEAN, B. H.; NADARAJAH, K. Transposable Elements Adaptive Role in Genome Plasticity, Pathogenicity and Evolution in Fungal Phytopathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3597, 23 jul. 2019.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 145–155, nov. 2007.

MICHAEL, T. P. Plant genome size variation: bloating and purging DNA. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 4, p. 308–317, 1 jul. 2014.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classificação e mecanismo de infecção dos fungos entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 1-9, 2017.

MUÑOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PEREZ, J. L. DNA Transposons: **Nature and Applications in Genomics**. Current Genomics, v. 11, n. 2, p. 115–128, 1 abr. 2010.

NAVARRETE, K. et al. Molecular characterization of the niaD and pyrG genes from Penicillium camemberti, and their use as transformation markers. **Cellular and Molecular Biology Letters,** v. 14, n. 4, p. 1-14, 2009.

NGUYEN, K. T. et al. A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus Aspergillus oryzae using Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, 2 maio 2017.

OLIVEIRA, C. M. et al. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n. 1–2, p. 1–15, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

PEDRINI, N. The Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana Shows Its Toxic Side within Insects: Expression of Genes Encoding Secondary Metabolites during Pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 488, 7 maio 2022.

PEDRINI, N. et al. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana: Hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 2, p. 226-236, 2013.

PLATT, R. N.; VANDEWEGE, M. W.; RAY, D. A. Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution. **Chromosome Research**, v. 26, n. 1-2, p. 25–43, 1 fev. 2018.

PUNT, P. J. et al. Transformation of Aspergillus based on the hygromycin B resistance marker from Escherichia coli. **Gene**, v. 56, n. 1, p. 117–124, 1 jan. 1987.

RAJKUMAR, G.; ASHOKUMAR, K.; THAVARANJIT, A. C. A Comparative study on plasmid isolation from strains of Enterobacter aerogenes using different optimized procedures. **Vingnanam Journal of Science**, v. 15, n. 2, p. 29, 25 dez. 2020.

REIS, C. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 197–202, ago. 2004.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. P. A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005.

ROOT ANALYSIS. Agricultural Biologicals Market. 2024.

SÁMANO, M. L.; NANJAREDDY, K.; ARTHIKALA, M. K. NIN-like proteins (NLPs) as crucial nitrate sensors: an overview of their roles in nitrogen signaling, symbiosis, abiotic stress, and beyond. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 30, n. 7, p. 1209–1223, 1 jul. 2024.

SÀNCHEZ-FERNÀNDEZ, R. et al. Transformation of the filamentous fungus Gibberella fujikuroi using the Aspergillus niger niaD gene encoding nitrate reductase. **Molecular and General Genetics**, v. 225, n. 2, p. 231–233, fev. 1991.

SANTHOSH, K.; NAMACHIVAYAM, V.; NAGARAJAN, M. Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management: The Role of Beauveria bassiana. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 28, p. 962-968, 12 jun. 2025. DOI: 10.9734/jabb/2025/v28i62454.

SCHREVENS, S.; SANGLARD, D. Hijacking Transposable Elements for Saturation Mutagenesis in **Fungi. Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, 13 abr. 2021.

SWATI SUREKA et al. Standardization of Functional Reporter and Antibiotic Resistance Cassettes to Facilitate the Genetic Engineering of Filamentous Fungi. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 12, p. 960–962, 19 dez. 2014.

TAKASAKI, K. et al. Unusual transcription regulation of the niaD gene under anaerobic conditions supporting fungal ammonia fermentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 978–980, abr. 2004.

THAI, H.-D. et al. Development of a new Agrobacterium-mediated transformation system based on a dual auxotrophic approach in the filamentous fungus Aspergillus oryzae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, 4 maio 2021.

TRAN, M. T. et al. CRISPR/Cas9-based precise excision of SlHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 6, p. 999–1011, 19 out. 2020.

ULFSTEDT, M. et al. Testing of Auxotrophic Selection Markers for Use in the Moss Physcomitrella Provides New Insights into the Mechanisms of Targeted Recombination. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 3 nov. 2017.

UNKLES, S. E. et al. The development of a homologous transformation system for Aspergillus oryzae based on the nitrate assimilation pathway: A convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. **Molecular and General Genetics**, v. 218, n. 1, p. 99–104, 1 jul. 1989.

USAI, G. et al. DNA Modification Patterns within the Transposable Elements of the Fig (Ficus carica L.) **Genome**. Plants, v. 10, n. 3, p. 451, 27 fev. 2021.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149–159, nov. 2009.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2012.

WANG, C.; ST LEGER, R. J. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. **Nature Biotechnology**, 25(12):1455-1456, 2007.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. The Metarhizium anisopliae perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21110-21115, 2007.

WANG, J.; ST. LEGER, R. J.; WANG, C. H. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. In: LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. (Ed.). **Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi**. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 67–105.

WANG, L. et al. An efficient sorghum transformation system using embryogenic calli derived from mature seeds. **PeerJ**, v. 9, p. e11849, maio 2021.

WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M. (Ed.). **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. Wallingford: CABI, 2008. p. 5–31.

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

XIA, J. et al. Analysis of Whitefly Transcriptional Responses to Beauveria bassiana Infection Reveals New Insights into Insect-Fungus Interactions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68185, 5 jul. 2013.

XIAO, G. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in Beauveria bassiana. **Scientific Reports**, v. 2, n. 483, 2012.

YING, S. H.; FENG, M. G. Novel blastospore-based transformation system for integration of phosphinothricin resistance and green fluorescence protein genes into Beauveria bassiana. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 941-952, 2019.

ZHANG, H. et al. Establishing an efficient callus genetic transformation system for the tung tree (Vernicia fordii). **Industrial Crops and Products**, v. 211, p. 118264, maio 2024.

ZHANG, S. et al. Sulfonylurea resistance as a new selectable marker for the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1151–1156, 7 maio 2010.

ZHANG, Y.-J. et al. Establishment of polyethylene-glycol-mediated protoplast transformation for Lecanicillium lecanii and development of virulence-enhanced strains against Aphis gossypii. **Pest Management Science**, v. 72, n. 10, p. 1951–1958, 19 fev. 2016.

ZHENG, H. et al. Riboflavin level manipulates the successive developmental sequences in Aspergillus nidulans. **Current Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 637–642, maio 2015.

## 8. CURRICULUM VITAE

**Braga, M. L.**

## 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Matheus Lopes Braga
**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS – Brasil - 06/09/1999
**Endereço Profissional:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale
Agronomia – Porto Alegre
CEP 91500-970
**Endereço eletrônico:**
Email para contato: matheuslopesbraga.0609@gmail.com

## 2. FORMAÇÃO:

2023 – 2025 Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Centro de Biotecnologia – UFRGS – CBIOT, Brasil.
Título: Sistemas de transformação em *Beauveria bassiana*
Orientador: Charley Christian Staats.
2019 – 2023 Graduação em Biotecnologia – Bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Produção de metabólitos estimulante do crescimento de plantas a partir de uma coleção de microrganismos.
Orientador: Alexandre José Macedo.

## 3. ESTÁGIOS:

**2021 – 2022** Bolsista de Iniciação Científica do projeto de pesquisa Síntese de chalconas e dibenzilideno cetonas contendo bromo e ferroceno. Instituto de Química, Laboratório de Catálise Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Bolsa: Bolsa Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis (PRAE)
Orientador (a): Adriano Lisboa Monteiro

**2022 – 2023** Bolsista de Iniciação Científica do projeto de pesquisa Produção de metabólitos estimulantes do crescimento de plantas a partir de uma coleção de microrganismos ambientais. Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biofilmes e Diversidade Bacteriana Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Bolsa: Bolsa Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis (PRAE)
Orientador (a): Alexandre José Macedo.

## 4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ANTONIOLLI, H. R. M. ; **BRAGA, M. L.** ; Staats, Charley Christian . Signals of horizontal transfer events in the evolutionary history of *hupfer* transposons in *Cordycipitaceae* (*Ascomycota: Hypocreales*). 2025. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**BRAGA, M. L.**; RIBEIRO, IGOR DANIEL ALVES ; Staats, Charley Christian . Development of a Dual-Marker Selection System for Targeted Gene Co-Editing in *Beauveria bassiana*. 2025. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**BRAGA, M. L.**; RIBEIRO, IGOR DANIEL ALVES ; Staats, Charley Christian . Standardization of Genetic Transformation Methodology and Marker Selection for Gene Co-Editing in *Beauveria bassiana*. 2024. (Apresentação de Trabalho/Congresso).