

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Desenvolvimento de um sistema de expressão em *Metarhizium
anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene *tef-1 α***

Tese de Doutorado

Luciano Nakazato

Porto Alegre

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Desenvolvimento de um sistema de expressão em *Metarhizium
anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene *tef-1* α**

Luciano Nakazato

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

ORIENTADORES: Augusto Schrank
Marilene Henning Vainstein

**Porto Alegre
2005**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do CNPq, Capes, FAPERGS, PADCT III e PICDT.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais;

A Valéria, Bruno e Fabinha;

Aos orientadores Augusto e Marilene não só pelo grande conhecimento científico, mas acima de tudo confiança;

Aos colegas, mas antes de tudo amigos, do Lab. 205: Paulo, César, Charley, Leonardo Broetto, Márcia, Lucélia, Walter, Ana Paula; Juliano, Lenise, Melissa Camassola e Ana Carolina;

Aos Colegas do 107: Valquiria, Melissa Francheschini, Agnes, Livia, Josie e Viviane;

Aos Colegas do 210: Mateus, Carlos, Deise, Fernando, Ricardo, Shana;

Aos Colegas do 216: Cristiano, Larissa e Alessandra;

Aos Professores Arnaldo, Irene, Henrique, Giancarlo e Itabajara;

A Silvia Regina e Luciano Saucedo

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, UFMT.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
1.1.1 Morfologia, classificação e importância.	3
1.1.2 O processo de infecção	5
1.2 Sistema de expressão em <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
1.2.1 Vetores de expressão em <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
1.3 Fator de alongamento de cadeia 1 α.....	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>.....	13
3.2 Linhagem de <i>Metarhizium anisopliae</i>.....	13
3.3 Meios de cultivo e manutenção de microrganismos.....	13
3.4 Extração de ácidos nucleicos	14
3.4.1 Extração de DNA de plasmídeos.....	14
3.4.2 Extração de DNA de <i>M. anisopliae</i>	14
3.4.3 Extração de RNA de <i>M. anisopliae</i>	15
3.5 “Screening” de banco de cDNA.....	16
3.6 “Screening” de banco genômico	16
3.7 PCR inverso (iPCR)	17
3.8 Hibridização de ácidos nucleicos	18
3.8.1 Hibridização de DNA (<i>Southern Blot</i>).....	18

3.8.2	Hibridização de RNA (<i>Northern Blot</i>)	19
3.9	Vetores, enzimas de restrição, enzimas de modificação, marcadores de tamanho molecular e soluções.....	19
3.10	Sequenciamento e análise das seqüências	20
3.11	Transformação de <i>Metarhizium anisopliae</i>	20
3.12	Bioensaios de transformantes em carrapato <i>Boophilus microplus</i>	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Isolamento e caracterização do cDNA do gene <i>tef1-α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4.2	Isolamento e caracterização do gene <i>tef1-α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
4.3	Análise filogenética de genes ortólogos a <i>tef1-α</i>	33
4.4	Análise da expressão do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
4.5	Construção de um vetor de expressão para <i>Metarhizium anisopliae</i>	36
4.6	Bioensaio dos transformantes	40
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8	APÊNDICE 1	71
9	APÊNDICE 2	73
10	APÊNDICE 3	73
11	APÊNDICE 4	81

Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Silveira Schrank I, Henning Vainstein M, Schrank A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology*. 155(4):245-51.

Manuscrito: Luciano Nakazato, Valéria Dutra, Leonardo Broetto, Charley Christian Staats, Marilene, Henning Vainstein, Augusto Schrank (**submetido AMB-05-12707**) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1 α* homologous promoter. Applied Microbiology and Biotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
aa	Aminoácidos
cm	Centímetro
cDNA	Seqüência de DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, sal sódico
ESTs	Expressed Sequence Tags
G	grama, aceleração da gravidade
GLI	Glicose
H	Hora
IPTG	Isopropionil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons = 1.000 daltons
L	Litro
M	Molar
mA	Miliamper
MC	Meio de Cove
MCc	Meio de Cove completo
min	Minuto
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
ON	“Over night”
Pb	Pares de bases
PgpdA	Promotor do gene gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
pH	Potencial hidrogeniônico
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
<i>Ptef</i>	Promoter do gene <i>tef-1α</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecilsulfato de sódio
S	Segundos
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Triton X-100	Éter octilfenólico de decaetilenoglicol
<i>Ttrpc</i>	Região terminadora do gene <i>trpC</i>
U	unidade de atividade enzimática
U.V.	Radiação ultravioleta
V	Volts
V/h	Volts por hora
v/v	Volume por volume
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise dos clones de cDNA de <i>Metarhizium anisopliae</i> . -----	23
Figura 2. Seqüência do cDNA do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> -----	24
Figura 3. Comparação da seqüência de aminoácidos do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> com ortólogos de fungos.-----	25
Figura 4. Padrão de hibridização de clones genômicos de <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> . -----	27
Figura 5. Padrão de hibridização do clone D genômico (no vetor Lambda Gem-11).-----	28
Figura 6. Seqüência da provável região promotora do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> com possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição (Signal Scan: http://thr.cit.nih.gov/molbio/signal/). -----	29
Figura 7. Mapa físico do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> -----	29
Figura 8. Padrão de hibridização do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> -----	31
Figura 9. Amplificação de fragmento <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> por iPCR.-----	31
Figura 10. Gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> . -----	32
Figura 11. Árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos do gene <i>tef1-α</i> . -----	34
Figura 12. Análise da expressão do gene <i>tef-1α</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i> . -----	35
Figura 13. Vetores utilizados para testar a funcionalidade do promotor <i>PtefMa</i> . -----	38
Figura 14. Análise dos transformantes de <i>Metarhizium anisopliae</i> com o plasmídeo pTEFGFP.-----	39

Figura 15: Análise dos transformantes de <i>Metarhizium anisopliae</i> expressando GFP.-----	39
Figura 16: Bioensaio em <i>Boophilus microplus</i> comparando a patogenicidade dos transformantes (T1 e G2) e a cepa selvagem durante 10 dias. -----	41
Figura 17: Expressão de GFP sob controle do promotor <i>PtefMa</i> (transformante T1) durante a infecção do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .-----	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> e seus respectivos genótipos e origem...13	
Tabela 2. Comparação do promotor de <i>Ptef</i> de <i>M anisopliae</i> e <i>PgpdA</i> de <i>A. nidulans</i> na eficiência de transformação. Seleção por expressão do gene <i>bar</i>40	

RESUMO

Vetores de expressão são ferramentas moleculares úteis para investigar a função de genes tanto em sistemas procarióticos quanto eucarióticos. O fungo *Metarhizium anisopliae*, utilizado no controle biológico de artrópodes, é bem caracterizado em nível molecular. Genes candidatos a participar do processo de infecção de hospedeiros tem sido isolados utilizando estratégias em que o gene candidato é predefinido (enzimas hidrolíticas, por exemplo) ou estratégias mais globais como projetos de ESTs e a análise de bibliotecas de subtração. A superexpressão tem sido o método adotado para verificar a participação de genes isolados no processo de infecção. Esta estratégia tem sido baseada no promotor heterólogo *PgpdA* de *Aspergillus nidulans*. Neste trabalho, o gene que codifica o fator de alongamento de tradução *tef-1 α* de *Metarhizium anisopliae* foi clonado e a sua região promotora foi localizada e utilizada na construção de um vetor de expressão. Somente uma cópia do gene *tef-1 α* está presente no genoma de *M. anisopliae* e o seu perfil de expressão foi analisado. Uma árvore filogenética foi construída baseada nos ortólogos de *tef-1 α* e mostrou uma alta correlação com o fungo *Cordyceps taii*. A região de 639 pb à montante do codon de iniciação (ATG) foi utilizada com sucesso para a expressão do gene repórter sGFP e do gene *bar*, que confere resistência ao glifosinato de amônio, em *M. anisopliae*. Os transformantes construídos não apresentaram alteração na sua virulência em bioensaios com carrapatos, em relação a linhagem receptora. Além disso, demonstramos que o nível de expressão permite a detecção óptica da fluorescência de sGFP durante a infecção dos carrapatos. Desta forma, o vetor desenvolvido será uma ferramenta útil para a superexpressão em *Metarhizium*.

Abstract

Expression vectors are molecular tools useful to investigate gene function in prokaryotic and eukaryotic systems. The arthropod pest control fungus, *Metarhizium anisopliae*, is well characterized at the molecular level. Genes with potential participation in the host infection process have been isolated by both targeting purposeful genes (e.g. hydrolytic enzymes) and global strategies as EST sequencing and subtraction libraries analysis. The overexpression of isolated genes is the method currently applied in *Metarhizium* to assign gene function of isolated genes. It has been based on vectors using the heterologous promoter *PgpdA* from *Aspergillus nidulans*. In this work, the *M. anisopliae* translation elongation factor *tef-1 α* cDNA and genomic sequences were cloned, characterized and an expression system was constructed based on its promoter region. A single copy of *tef-1 α* gene was found in *M. anisopliae* and its expression profile was analyzed. A phylogenetic tree, based on *tef-1 α* orthologs, showed a close relation with *Cordyceps taii*. The 639 bp fragment upstream to the start codon (ATG) was shown to drive the expression of the reporter gene sGFP and the *bar* gene, rendering ammonium glufosinate resistant transformants. *M. anisopliae* carrying these constructs showed no altered virulence against ticks and the expression of the sGFP was sufficient for optical detection during tick infection. Therefore, the vector herein developed will be a useful tool for overexpression in *Metarhizium*.

1 Introdução

Diferentes microrganismos têm sido utilizados no controle biológico de pragas destacando-se as bactérias como *Bacillus thuringiensis* e os fungos, principalmente *Metarhizium anisopliae* e *Beuveria bassiana* (ALVES, 1998).

A utilização de microrganismos no controle biológico apresenta como principal desvantagem, em relação ao controle químico, o período maior de tempo entre a aplicação e a morte da praga alvo (ROBERTS & LEGER, 2004). Como exemplo, a utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* (“Green Muscle”) para controle efetivo de gafanhotos varia entre 10 a 20 dias (HAJECK *et al.*, 2001). Isto tem impedido uma maior expansão comercial da utilização de microrganismos no controle biológico (HARRISON & BONNING, 1998; HAJECK *et al.*, 2001).

Esta desvantagem pode ser contornada se os determinantes de patogenicidade forem caracterizados e o processo de infecção for mais bem conhecido. Assim seria possível alterar ou selecionar linhagens com um padrão de expressão de determinados genes mais adequado para aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros. A literatura nos últimos dez anos tem mostrado um número crescente de publicações que isolam e caracterizam genes com potencial envolvimento no processo de infecção de hospedeiros (SILVA *et al.*, 2005, BEYS-SILVA *et al.*, 2005; BOGO *et al.*, 1998, ST LEGER *et al.*, 1992). Além do trabalho com a caracterização de genes definidos *a priori*, as metodologias que avaliam, de forma mais global, genes envolvidos em determinados processos, como projetos de ESTs e metodologias de isolamento de genes com expressão diferencial tem sido aplicadas a *Metarhizium* (DUTRA *et al.*, 2004, FREMOSIER *et al.*, 2003), principalmente aqueles potencialmente envolvidos no processo de penetração do hospedeiro.

Entretanto, após o isolamento e a caracterização destes genes, é necessário verificar e comprovar a sua participação no processo de infecção. Para tal, metodologias de superexpressão têm sido utilizadas em *Metarhizium* (ST LEGER *et al.*, 1996; SCREEN *et al.*, 2001; FRANCHESCHINI, 2005). Tanto para esta estratégia quanto para experimentos com outros tipos de abordagem (RNA anti-senso, por exemplo) necessita-se de vetores de expressão baseados em promotores constitutivos. Até o final do presente trabalho não encontramos na literatura nenhuma descrição de promotor de *Metarhizium* isolado e caracterizado e passível de utilização na construção de vetores de expressão.

Na literatura o promotor utilizado para experimentos de superexpressão em *M. anisopliae*, tem sido o promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*PgpdA*) oriundo do fungo *Aspergillus nidulans* (ST LEGER *et al.*, 1996; SCREEN *et al.*, 2001; FRANCHESCHINI, 2005). Embora tenha sido usado com sucesso este promotor heterólogo provavelmente não tem grande eficiência em *Metarhizium*, o que pode ser importante para descobrir a função de genes isolados, estudar a sua expressão temporal e a localização sub-celular da proteína. Ainda, promotores homólogos poderiam ser utilizados em sistemas de expressão para a obtenção de linhagens mais eficazes no controle biológico (ROBERTS & ST LEGER, 2004).

Neste trabalho mostraremos o isolamento e a caracterização do gene que codifica o fator de alongamento da tradução (TEF-1 α) de *Metarhizium anisopliae* e a localização do promotor funcional *Ptef-1 α* . Ainda, a funcionalidade da seqüência isolada foi avaliada utilizando dois sistemas repórter distintos: um baseado na proteína verde fluorescente de *Aequoria vitória* (sGFP), permitindo acompanhar a expressão da proteína em transformantes de *M. anisopliae* e durante a infecção do carrapato *Boophilus microplus* e o outro baseado em uma marca dominante, a

resistência a glifosinato de amônia, pela expressão do gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

1.1 O fungo *Metarhizium anisopliae*

1.1.1 Morfologia, classificação e importância.

M. anisopliae é um fungo ascomiceto que foi isolado inicialmente de insetos mortos (*Anisoplia austriaca*) na Ucrânia em 1879 por METSCHNIKOFF. *M. anisopliae* foi o primeiro fungo produzido em larga escala e utilizado no combate de insetos pragas (controle biológico) (STEINHAUS, 1975).

A classificação taxonômica do gênero *Metarhizium* em duas espécies foi introduzida por TULLOCH (1976), a qual aceitou somente as espécies *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, sendo as demais espécies classificadas como variedades. Recentemente, DRIVER *et al.* (2000), adicionaram uma nova espécie, *Metarhizium album*, baseados nas análises filogenéticas do DNA ribossômico (5.8S, 28S e ITS) e RAPD-PCR. Este mesmo estudo agrupou 5 variedades em *M. flavoviride* (var. Type E, var. novazelandicum, var. pemphigum, var. minus e var. flavoviride) e 4 grupos em *M. anisopliae* (var. *acridum*, var. *anisopliae*, var. *majus* e var. *lepidiotum*).

O estágio sexual (teleomórfico ou perfeito) de *Metarhizium* sp ainda não foi obtido em laboratório, o que dificulta muito a sua classificação (ROBERTS & ST LEGER, 2004). LIANG *et al.*, (1991), entretanto, cultivaram um fungo imperfeito (anamórfico) a partir de *Cordyceps taii* e o classificaram como *Metarhizium taii*. Posteriormente, o fungo *Cordyceps brittlebankisoides*, também apresentou uma forma imperfeita sendo caracterizado como *M. anisopliae* var. *majus*, embora os

esporos sejam menores que os descritos para esta variedade (LIU *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002).

O habitat natural do gênero *Metarhizium* spp. ainda permanece incerto. O isolamento de *Metarhizium* spp. a partir de solos em todo mundo, com exceção da Antártica, sugere uma distribuição mundial (GOETTEL & INGLIS, 1997). Pouco se conhece, entretanto, se o isolado é originário de um conídio, micélio sobrevivendo em restos de artrópodes ou micélio sobrevivendo em outros substratos (INGLIS *et al.*, 2001). BIDOCHKA *et al.* (2001) analisando isolados de *M. anisopliae* de diversos hospedeiros e regiões concluíram que existe uma maior ligação genética entre os isolados do mesmo tipo de ambiente (campo aberto ou floresta) do que com os hospedeiros dos quais foram isolados. Devido a isto, acredita-se que a forma saprofítica residente no solo seja mais importante na seleção de *Metarhizium anisopliae* do que realmente a fase parasitaria em artrópodes.

M. anisopliae tem sido utilizado em diversos países no combate a insetos pragas (ALVES, 1998). *M. anisopliae* infecta mais de 300 espécies de artrópodes. Segundo o mesmo autor, os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae* no Brasil são o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva frimbriolata*); das cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), do cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), do cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), da broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e da broca dos citros (*Diploschema rotundicolle*). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas, como o da doença de Chagas (*Triatoma infestans*), da malária (*Anopheles gambiae*) e da filariose (*Culex quinquefasciatus*) (JUÁREZ *et al.*, 2000; SCHOLTE *et al.*, 2003; BLANFORD *et al.*, 2005). Na Tanzânia em um estudo para controle da malária, *M. anisopliae* diminuiu a intensidade de

transmissão em 75%, através de iscas colocadas dentro das casas, surgindo como alternativa para o controle químico (SCHOLTE *et al.*, 2005). Recentemente foi testado em controle de pragas da erva-mate (OLIVEIRA *et al.*, 2004) e no controle de baratas (QUESADA-MORAGA *et al.*, 2004).

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *M. anisopliae* no controle de ácaros, principalmente carrapatos dos gêneros *Boophilus* (FRAZZON *et al.*, 2000; ONOFRE *et al.*, 2001; DA COSTA *et al.*, 2001; SAMISH & REHACEK, 1999), *Rhipicephalus*, *Amblyoma* (KAAYA *et al.*, 1996; SAMISH & REHACEK, 1999) e *Ixodes* (BENJAMIN *et al.*, 2002), e sarna dos gêneros *Psorptes* (SMITH *et al.*, 2000; BROOKS & WALL, 2001) e *Varroa* (KANGA *et al.*, 2002; KANGA *et al.*, 2003)

1.1.2 O processo de infecção

A infecção de *M. anisopliae* é um processo multifatorial, no qual estímulos físicos e químicos provenientes da superfície do hospedeiro induzem uma interação complexa de vários fatores do fungo, incluindo fosforilação de proteínas, regulação de fatores transcricionais e alterações fisiológicas. Como resposta, há formação do tubo germinativo e do apressório, uma estrutura especializada que realiza uma pressão mecânica na cutícula do hospedeiro (St LEGER *et al.*, 1991; MILNER, 2000).

Durante a penetração, diversas enzimas hidrolíticas são produzidas e secretadas para degradar e, conseqüentemente, penetrar a cutícula do hospedeiro, entre elas lípases, proteases e quitinases (ST LEGER *et al.*, 1986). As primeiras enzimas comprovadamente secretadas no início da penetração são as proteases, que participam da hidrólise da cutícula. É possível que lípases precedam as proteases devido à camada de composição lipídica que é depositada na epicutícula dos artrópodes (ST LEGER *et al.*, 1986). Entretanto,

muito pouco tem sido relatado em relação às lípases que comprovadamente são secretadas por *M. anisopliae* (BEYS-SILVA *et al.*, 2005). A degradação das proteínas da cutícula parece ser dependente da interação eletrostática entre enzimas do fungo e proteínas presentes no hospedeiro (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). A atividade quitinolítica decorre à proteolítica devido à estrutura física da cutícula de artrópodes, pois, as fibras de quitina funcionam como sítio de ancoramento para proteínas, estando, portanto recobertas por uma matriz de natureza protéica (BIDOCHKA *et al.*, 1997, SILVA *et al.*, 2005).

Após atravessar a cutícula, *M. anisopliae* encontra um ambiente rico em nutrientes, dissemina-se rapidamente, através da hemolinfa, por todos os tecidos e produz diversas toxinas, principalmente dextruxinas (A, B e D), que ocasionam paralisia e conseqüentemente a morte do hospedeiro (BIDOCHKA *et al.*, 1997; KERSHAW *et al.*, 1999). Quando os nutrientes do hospedeiro morto são exauridos, ocorre a esporulação do *Metarhizium* e sua disseminação no ambiente (CLARKSON *et al.*, 1996; ROBERTS & LEGER, 2004).

Recentemente, diversos trabalhos apontam para uma resposta específica, ou seja, uma alteração de expressão gênica de *M. anisopliae* conforme o hospedeiro parasitado. Um exemplo é a diferença de expressão de proteases e proteínas hipotéticas cultivados em diferentes cutículas de hospedeiros (DUTRA *et al.*, 2004; FREIMOSER *et al.* 2005).

1.2 Sistema de expressão em *Metarhizium anisopliae*

1.2.1 Vetores de expressão em *Metarhizium anisopliae*

Após a rigorosa demonstração de transformação do fungo *Neurospora crassa*, no final da década de 70 (HINNEN *et al.*, 1978), diversos sistemas de expressão tem sido desenvolvido em fungos (FINCHAM, 1989; MICHIELSE *et al.*, 2005).

Os vetores de expressão em fungos filamentosos são geralmente plasmídeos, sendo que a região responsável pela expressão (cassetes) apresenta três componentes: região promotora, região codificadora (gene de interesse) e região terminadora (BERKA & BARNETT, 1989).

Em *Metarhizium anisopliae* o primeiro vetor de expressão utilizado foi o plasmídeo pNOM102 (ST LEGER *et al.*, 1995), que contém um marcador molecular importante para estudos microbiológicos ambientais. Este plasmídeo apresenta o gene da β -glicuronidase (*gusA*) de *E. coli* sob o controle da região promotora do gene gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (*PgpdA*) (PUNT *et al.*, 1990) e a região terminadora do gene *trpC* (*TtrpC*) (MULLAMEY *et al.*, 1985) ambos de *Aspergillus nidulans*.

Transformantes de *M. anisopliae* super-expressando os genes homólogos da protease PR1A e da quitinase (CHIT1) foram obtidos por ST LEGER *et al.* (1996) e SCREEN *et al.*, (2001), respectivamente. Os vetores pMAPR-1 e p324-Chit1, utilizados na transformação, também apresentam os mesmos elementos reguladores (*PgpdA* e *TtrpC*), descritos anteriormente.

A transformação de *M. anisopliae* var. *acridium*, com o plasmídeo pEGFP para expressão da proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* foi descrita por INGLIS *et al.* (2000). Este vetor apresenta como modificação a inserção de seqüências teloméricas repetitivas (TTAGGG)₁₈ de *Fusarium oxysporum*, porém os transformantes apresentaram inserções em regiões teloméricas e não teloméricas (INGLIS *et al.*, 2000).

Em um estudo de campo, com *M. anisopliae* expressando GFP, foi utilizado para avaliar a capacidade de se estabelecer e permanecer na rizosfera, a região promotora do gene *gapdh* do fungo *Cryphonectria parasitica* (HU & ST LEGER, 2002).

Até o presente momento, no entanto, somente utilizam-se vetores de expressão com promotores heterólogos em *M. anisopliae* (ST LEGER *et al.*, 1996; INGLIS *et al.*, 2000). Sistemas de expressão que utilizam promotores homólogos têm demonstrado maior nível de expressão quando comparados com os promotores heterólogos, tanto em fungos (HONDEL & PUNT, 1991; MACH *et al.*, 1994, MACKENZIE *et al.*, 2000) quando em células de mamíferos (KIM *et al.*, 1990; GOPALKRISHNAM *et al.*, 1999; NISHIMURA *et al.*, 1999).

1.3 Fator de alongamento de cadeia 1 α

O fator de alongamento da tradução 1 alfa (TEF-1 α) de eucariotos, também denominado fator de alongamento eucariótico 1 alfa (eEF1A), é um membro altamente conservado da família das GTPase, que incluem fatores protéicos envolvidos no início, alongamento e término da tradução (KEELING *et al.*, 2004; BALDAUF *et al.*, 1993). O TEF-1 α (ativo), associado ao GTP (GTP-TEF), liga-se ao aminoacil-tRNA (aa-tRNA) e o direciona para o sitio A do ribossomo. O aa-tRNA é então liberado com a hidrólise de GTP formando GDP-TEF (inativo). Este complexo associa-se ao TEF-1 β , cuja função é regenerar GDP a GTP, possibilitando a entrada em um novo ciclo de alongamento da cadeia peptídica. Outras funções celulares, não associadas ao alongamento da tradução, são as interações com proteínas do citoesqueleto, calmodulina e com o sistema proteolítico dependente de ubiquitina (NEGRUTSKII & EL'SKAYA, 1998)

O número de cópias genômicas do gene que codifica TEF-1 α varia em diferentes organismos. Em humanos, por exemplo, no mínimo, 20 cópias são descritas, sendo a maioria considerada pseudogenes e somente duas cópias são aparentemente funcionais (MADSEN *et al.*, 1990), assim como em

Saccharomyces cerevisiae (SCHIRMAIER & PHILIPPSEN, 1984), *Drosophila melanogaster* (HOVEMANN *et al.*, 1988) e *Rattus norvegicus* (SHIRASAWA *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1992).

Devido a sua função essencial TEF-1 α apresenta-se como uma das proteínas celulares mais abundantes, sendo considerado como um gene “housekeeping” com região promotora forte (NEGRUTSKII & EL'SKAYA, 1998).

Outra característica importante é a conservação da seqüência em nível de aminoácidos, que tem sido utilizada para análises filogenéticas em diversos organismos como fungos (GENTILE *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2004; CURRIE *et al.*, 2003), protozoários (ROGER *et al.*, 1999) algas (NOZAKI *et al.*, 2003) e helmintos (OLSON & CAIRA, 1999).

Outra aplicação importante é a utilização da região promotora (*Ptef*) com diversas finalidades. Devido à expressão constitutiva do gene, a sua região promotora tem sido fusionada a diversos genes de resistência a droga para seleção em sistema de transformação em fungos. O gene de resistência a neomicina, sob o controle do promotor *tef 1 α* de *Absidia glauca*, foi utilizado para transformação de *A. glauca* e *Parasitella simplex* como marca de seleção (BURMESTER *et al.*, 1992; BURMESTER, 1995). Em *Aureobasidium pullulans* e *Arxula adenivorans*, a construção de diversos cassetes contendo o gene de resistência à higromicina B (HmB^r) com regiões variáveis do promotor *tef-1 α* homólogo apresentou uma alta eficiência de transformação quando comparado com sistemas contendo promotores heterólogos (THORNEWELL *et al.*, 1995; TARENTIEV *et al.*, 2004).

A alta produção de proteínas, baseado em vetores contendo *Ptef* homólogo ou heterólogo, tem sido alcançada em fungos de importância industrial, dentre elas as do gênero *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Yarrowia* e *Aspergillus*

(KITAMOTO *et al.*, 1998; MONSCHAU *et al.*, 1998; MUMBERG *et al.*, 1995; NAKARI-SETALA & PENTILLA, 1995; MULLER *et al.*, 1998).

KITAMOTO *et al.* (1999) e colaboradores inovaram ao utilizar o promotor de *tef-1 α* para construir um sistema de superexpressão e “anti-senso” para o gene beta xilosidase em *Aspergillus oryzae*. Neste trabalho, obtiveram-se transformantes com aumento de 13 vezes na produção da proteína (superexpressão) e diminuição de 20% (anti-senso) quando comparado com a cepa selvagem.

Diversos trabalhos demonstram a utilidade do promotor *tef-1 α* quando fusionados a genes repórteres como a proteína verde fluorescente (GFP) e luciferase (LUC) para analisar diversos fenômenos morfogênicos de fungos (VANDEN WYMELENBERG *et al.*, 1997; SCHILDE *et al.*, 2001; INOUE *et al.*, 2002; BREFORT *et al.*, 2005)

Em eucariotos superiores, a utilização de *Ptef* tem um campo promissor quando utilizado como vacinas de DNA ou terapias gênicas. Um exemplo é a indução de resposta imune em camundongos utilizando vacinas de DNA contendo genes do vírus da hepatite C e adenovirus sob controle de *Ptef* humano (NISHIMURA *et al.*, 1999; WALLICH *et al.*, 2001). Outra aplicação prática é a utilização destes vetores na terapia gênica (GIL *et al.*, 2001; HABIB *et al.*, 2004; OH *et al.*, 2004).

Diversos estudos *in vitro* utilizam o promotor do gene humano associados a genes repórteres (GFP e CAT) ou a marcas de resistência (JAKOBSSON *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2003). Comercialmente, em diversos cassetes o promotor do gene *tef-1 α* humano esta sendo utilizado para diversas finalidades devido a sua expressão constitutiva (<http://www.invitrogen.com>).

2 Objetivos

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao isolamento, caracterização e determinação da função de genes com potencial na participação do processo de penetração de *Metarhizium anisopliae*. Estes genes tem sido isolados buscando candidatos definidos *a priori* ou usando estratégias mais globais. Um aspecto fundamental é a obtenção de sistemas que permitam testar a função destes genes candidatos em bioensaios. Para isso temos desenvolvido sistemas de transformação, caracterizado genes de vias metabólicas que possam substituir marcas de resistência a drogas que restringem ensaios a campo e otimizando protocolos de transformação para *M. anisopliae*.

Um aspecto fundamental é o desenvolvimento de vetores de expressão que permitam utilizar a superexpressão ou o uso de metodologias de RNA anti-senso, para descobrir a função dos genes isolados.

2.1 Geral

Construção de um sistema de expressão em *Metarhizium anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene do fator de alongamento de tradução 1 α

2.2 Específicos

Clonar o gene *tef-1 α* de *Metarhizium anisopliae*.

Analisar o perfil de expressão do gene em diferentes fontes de carbono e fases de desenvolvimento.

Analisar a funcionalidade, em *M. anisopliae*, da região flanqueadora 5' do gene *tef-1 α* através da proteína repórter sGFP e da marca de seleção dominante *bar* para a resistência ao glifosinato de amônio.

Verificar se ocorrem alterações na patogenicidade de transformantes contendo as construções em bioensaios em carrapatos *Boophilus microplus* e verificar se a proteína recombinante pode ser detectada durante o processo de infecção.

3 Materiais e métodos

3.1 Linhagens de *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens de *Escherichia coli* e seus respectivos genótipos e origem.

Linhagem	Genótipo	Origem
XL1BLUE	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
Y1090 (ZL)	<i>ΔlacU169, proA⁺, Δlon, hsdR⁻, hsdM⁺, araD139, strA, supF, [trpC22::Tn10]</i>	Life technologies
DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mmr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λxis6 ind^r pZIP1 (pZIP1= P1 ori-kan^R-cre)</i>	Life technologies
LE392	<i>hsdR514(rK-mK⁺) supE44 supF58lacY galK2 galT22 metB1 trp55 mcrA</i>	Promega

3.2 Linhagem de *M. anisopliae*

A linhagem E6 foi utilizada nos experimentos, originalmente isolada no Espírito Santo e gentilmente cedida pelo Prof. João Lucio Azevedo (ESALQ).

3.3 Meios de cultivo e manutenção de microrganismos

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas e mantidas, em caldo ou agar Luria Bertani (LB) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

M. anisopliae foi mantido em placas de Petri com meio completo de Cove (MCc) a 4°C (Apêndice 1). Para a extração de DNA e obtenção de protoplastos

foram utilizados MCc líquido e Sabouraud, respectivamente (Apêndice 1). Esporos obtidos através do cultivo em placas de Petri contendo MCc (COVE, 1966) e incubados a 30°C por 3-7 dias foram suspensos das placas, com o auxílio de uma alça de platina e 10 mL de uma solução de Tween 80 a 0,1% (v/v), esterilizada em autoclave. A suspensão obtida foi lavada duas vezes, por centrifugação (3000 g por 10 min.), em água destilada autoclavada e os esporos foram contados em Câmara de Neubauer. As suspensões de esporos foram estocadas a 4°C por, no máximo, 15 dias para seu uso em cultivos.

3.4 Extração de ácidos nucleicos

3.4.1 Extração de DNA de plasmídeos

Mini-preparações de plasmídeos foram conduzidas essencialmente como descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001). Maxi-preparações foram preparadas por purificação em matriz de sílica gel conforme instruções do fabricante (CONCERT RAPID PLASMID PURIFICATION SYSTEMS – INVITROGEN).

3.4.2 Extração de DNA de *M. anisopliae*

Para extração de DNA de *M. anisopliae*, adicionou-se a 50 mL de meio MCc 5×10^7 conídios e incubados a 30°C sob agitação moderada (150 rpm) por 48h. O micélio foi coletado por filtragem a vácuo, secado e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de pó. Para cada grama de micélio, adicionaram-se 3 mL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA; 2% SDS e 1% β -mercaptoetanol), 0,6 mL de 5 M NaCl e 0,4 mL de uma solução contendo 10% CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e 0,7 M NaCl. A suspensão foi incubada a 65°C por 45 min, seguida de incubação a 37°C por 15 min, sendo adicionados então 4 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e agitados lentamente por

10 min. Centrifugou-se (12.000 g por 20min.) e o conteúdo de ácidos nucleicos presentes na fase superior foi coletada pela adição de 2,2 mL de isopropanol e posterior centrifugação (12 000 x g, 20min.), lavagem com etanol 70% e secagem. O sedimento contendo os ácidos nucleicos foi suspenso em 1 mL de água e incubado a 37°C por 15 min após a adição de RNase na concentração de 50 µg/mL. Seguiu-se extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2), centrifugação (12 000 x g, 20min.), e o DNA presente na fase superior foi precipitado pela adição de 0,8 mL de isopropanol e posterior centrifugação (12 000 x g, 20min.), lavagem com etanol 70% e secagem. O DNA foi então suspenso em 0,1 mL de TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8) (ZHANG *et al.*, 1996) e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.4.3 Extração de RNA de *M. anisopliae*

O micélio, coletado por filtragem, foi macerado em nitrogênio líquido e transferido rapidamente para tubo *ependorf* previamente preenchido com 0,75 mL de tampão de lise (0,6 M NaCl; 10 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 4% SDS) e 0,3 mL de fenol tamponado (100 mM Tris-HCl pH 8,0). A mistura foi levemente agitada por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm em micro-centrifuga. A fase aquosa foi extraída com 0,5 V de fenol tamponado e 0,5 V de clorofórmio, sendo então centrifugada em micro-centrífuga (10000 rpm por 10 min.). A fase aquosa foi novamente transferida e foram adicionados 0,75 V de cloreto de lítio (8M), sendo o tubo incubado a 4°C por 18h. Os ácidos nucleicos de simples fita foram separados por centrifugação (10000 rpm por 10 min.). O sedimento foi suspenso em 0,3 mL de água DEPC (dietilpirocarbonato/SIGMA) estéril, e re-precipitado em presença de: 0,03 mL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 0,75mL de etanol absoluto. Após um período de 2 horas à – 70°C, os ácidos nucleicos foram coletados por centrifugação (10.000 rpm por 10 min.), lavados

com etanol 70%, seco e suspenso em 0,03 mL de água DEPC (SOKOLOVSKY *et al.*, 1990). Contaminações de DNA presentes nas preparações de RNA total foram removidas pela incubação com DNase livre de RNase (Amersham Biosciences) segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.5 “Screening” de banco de cDNA

Para o isolamento do gene *tef-1* α foi construído um banco de cDNA a partir de RNA poli(A⁺) de *M. anisopliae* cultivado em meio MC contendo 1% de cutícula de *B. microplus* por 48h a 28°C a 200 rpm. Foi utilizado o kit “Superscript Lambda System for cDNA Synthesis and λ CloningTM” (Life Technologies) segundo as especificações do fabricante, sendo o banco mantido a 4°C. Como sonda, utilizou-se um fragmento do gene ortólogo de *tef-1* α de *Trichoderma harzianum* (MALCHER, 1996) marcado com o kit ECLTM (Amersham Biosciences). Os clones positivos foram coletados e eluídos em 500 μ L de SM (Apêndice 1) e submetidos a um “re-screening”. Os clones isolados foram excisados “*in vivo*” utilizando-se a cepa de *E. coli* DH10B. Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e seqüenciados conforme o item 10.

3.6 “Screening” de banco genômico

O “screening” genômico foi realizado em dois bancos, construídos a partir de DNA total de *M. anisopliae* digeridos parcialmente com Sau3A I e fracionados em gradiente de sacarose, sendo selecionados fragmentos de DNA de aproximadamente 20Kb (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Os vetores utilizados foram EMBL3 ou LambdaGEM-11 (PROMEGA), sendo os fragmentos clonados segundo o protocolo do fabricante. Para o “screening” dos bancos foram utilizados entre 1,4 a 2x10⁴ ufp, o que corresponde, no mínimo, a 3 vezes o

genoma de *M. anisopliae* (VALADARES-INGLIS & PEBERDY, 1998). A marcação da sonda foi realizada como descrito (item 3.8). Os clones positivos foram digeridos separadamente com as endonucleases Sall, Sall e EcoRI, XhoI e XbaI, sendo os fragmentos gerados sub-clonados no vetor pUC18, digerido com as respectivas enzimas. Os produtos da ligação foram transformados em *E. coli* XL1BLUE eletrocompetentes e selecionados em placas de LB ágar contendo ampicilina, IPTG e X-Gal. Plasmídeos foram preparados (item 3.4.1) e seqüenciados (item 3.10).

3.7 PCR inverso (iPCR)

O protocolo utilizado foi o descrito por Ochman (2001). Inicialmente escolheu-se a enzima de restrição que apresenta-se o menor sinal de hibridização com a sonda de *tef-1 α* , sendo neste caso escolhido a enzima EcoRI. Posteriormente, 2,5 μ g de DNA de *M. anisopliae* foram digeridos com a enzima EcoRI (7,5U) por 3 horas a 37°C. Após a inativação da enzima de restrição a 65°C por 15 min., realizou-se a circularização dos fragmentos de DNA através de reação de ligação: 2 μ L de DNA E6/EcoRI (100ng), 10 μ L de tampão 10X ligase buffer, 10 μ L ATP (10mM), 0,8 μ L de T4 DNA ligase™ Fermentas (5U/ μ L) e 77,2 μ L de H₂O. A reação foi incubada a 16°C o.n., sendo, posteriormente, inativada a 65°C por 15min e o DNA foi precipitado em presença de acetato de sódio (0,2M concentração final) e etanol absoluto (2 volumes). O DNA foi coletado por centrifugação, lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspenso em 2 μ L de H₂O.

Para a reação de iPCR utilizou-se 2 μ L da ligação acima descrita, 5 μ L de tampão 10X High Fidelity PCR Buffer, 1,5 μ L de Mg₂SO₄ (50mM), 2 μ L dNTP's (10mM), 2,5 μ L de oligonucleotídeo TEF1 (Apêndice 2) (20 μ M), 2,5 μ L de

oligonucleotídeo TEF2 (20 μ M), 0,5 μ L Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity™ Invitrogen (5U/ μ L) e 34 μ L de H₂O. A seqüência dos oligonucleotídeos utilizados TEF1 e TEF2 está descrita no Apêndice (2) e representam a região genômica correspondente aos exon 2 e 3 (Figura 7). A reação foi submetida a 94°C por 5 min, 35 ciclos (94°C por 30sec, 50°C por 30sec e 68°C por 3,5 min) e 68°C por 10min. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e, posteriormente, foi purificado e seqüenciado como descrito no item 3.10.

3.8 Hibridização de ácidos nucleicos

3.8.1 Hibridização de DNA (*Southern Blot*)

Para hibridização de “Southern blot” foi utilizado o protocolo padrão descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001), com algumas modificações. Inicialmente, alíquotas de 10 μ g de DNA genômico de *M. anisopliae* digeridos com endonucleases de restrição foram fracionados em gel de agarose (0,8%). A transferência do DNA para membranas carregadas positivamente realizou-se a vácuo (VacuGene XL, Amersham Biosciences). A fixação do DNA à membrana foi realizada em forno por 2 horas a 80°C. A membrana foi hibridizada com sonda marcada (ECL Direct™ Nucleic Acid Labeling and Detection Systems”, Amersham Biosciences) por 18h a 40°C, e as lavagens foram realizadas com tampão primário com uréia (1 a 2M), conforme instruções do fabricante. A detecção foi realizada através da exposição da membrana a filmes autoradiograficos X-OMAT(Kodak).

3.8.2 Hibridização de RNA (*Northern Blot*)

Para avaliação do perfil de expressão do gene *tef-1* α foi realizado “Northern Blot” em diferentes fases do desenvolvimento do fungo e em diferentes meios de cultivos. No primeiro caso, RNA total de *M. anisopliae* foi extraído (conforme item 3.4.3) de suspensão de esporos e de micélio cultivado em MCc (12h, 24h, 48h e 72h). No segundo caso, RNA total foi extraído de culturas do fungo em MC (item 3.4.3) acrescido de 1% de cutícula de *B. microplus* ou 1% de glicose. O RNA (15 μ g) foi fracionado em gel desnaturante contendo formaldeído (2,2M), e transferido por capilaridade para membranas de nylon carregadas positivamente (Amersham Biosciences), segundo (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As sondas foram marcadas e hibridizadas conforme os protocolos dos *kits* Gene Images™ Random-Prime Labeling and Detection System e CDP-Star detection module™ (Amersham Biosciences). A detecção foi similar ao descrito no item 3.8.1.

3.9 Vetores, enzimas de restrição, enzimas de modificação, marcadores de tamanho molecular e soluções.

O vetor pUC18 foi utilizado em todas as sub-clonagens segundo o protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001). As enzimas de restrição utilizadas foram EcoRI, BamHI, KpnI, Sall e XhoI (Invitrogen). As enzimas DNA polimerase I (Klenow) e polinucleotídeo quinase (Amershan) foram utilizadas no preenchimento e fosforilação de produtos de PCR. T4 DNA ligase (Fermentas) foi utilizada para as reações de ligação. As enzimas Platinum Taq DNA Polymerase Hi-Fi e Taq DNA polimerase foram adquiridas da Invitrogen e Cebiot, respectivamente. Todas as enzimas citadas foram utilizadas conforme o manual do fabricante, salvo quando mencionado outro protocolo.

3.10 Sequenciamento e análise das seqüências

Para o sequenciamento utilizou-se o *kit* Dyanamic ET Dye Terminator cycle sequencing e o seqüenciador MEGABACE1000 (Amersham Bioscences). O programa PHRED (EWING *et al.*, 1998) foi utilizado para análise de qualidade do sequenciamento, sendo somente considerado bases com valor superior a 30. Foi utilizada a infra-estrutura do projeto Genoma PIGS, coordenado pelo Prof. Arnaldo Zaha.

O programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi utilizado para a busca de genes ortólogos depositadas no GenBank. Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997).

A análise filogenética do gene *tef-1 α* baseou-se na comparação dos aminoácidos 100 a 426, com ortólogos de diversos fungos, através do programa ClustalX (matrix Blosum) e, posteriormente, a árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA2 (KUMAR *et al.*, 2001)

3.11 Transformação de *M. anisopliae*

A transformação de *M. anisopliae* foi obtida através do protocolo descrito por (BOGO *et al.*, 1999). Após a transformação os protoplastos foram regenerados por 18h a 30°C e plaqueados por “pour plate” em meio MC (Apêndice 1) contendo 50µg/mL de glifosinato de amônio. Os possíveis transformantes foram repicados até quatro gerações para placas novas com meio seletivo e incubadas até a esporulação. A confirmação dos transformantes foi realizada por “Southern blot” (item 3.8.1) utilizando-se como sonda o gene *sGFP* ou *bar* marcado (“ECL Direct™ Nucleic Acid Labeling and Detection Systems” Amersham Biosciences).

Os transformantes expressando sGFP também foram analisados quanto a sua fluorescência através de microscopia de epifluorescência (Carl-Zeiss) com filtros de absorção de 450-490nm e 520nm de emissão.

3.12 Bioensaios de transformantes em carrapato *Boophilus microplus*

Para as análises da patogenicidade da linhagem selvagem e os transformantes de *M. anisopliae* foram utilizadas teleóginas do carrapato *B. microplus* gentilmente cedidas pelo Dr. João Ricardo Martins (Laboratório de Parasitologia/IPVDF).

Para cada linhagem (T2, G2, E6 e controle negativo) foram utilizadas três repetições com 25 teleóginas adultas de *B. microplus*. Em todas as linhagens, o fungo foi aplicado nos carrapatos por imersão em suspensões contendo 10^7 esporos/mL. Nos controles negativos a suspensão de esporos foi substituída por água estéril. Todos os tratamentos foram incubados a 28°C por 10 dias em câmara úmida, sendo observados diariamente para determinação da mortalidade. A comparação de médias de teleóginas mortas foi analisada estatisticamente pelo teste T ($P < 0,01$).

4 RESULTADOS

Objetivando obter promotores constitutivos mais eficientes de *Metarhizium anisopliae* para a construção de vetores de expressão, isolamos, identificamos e demonstramos a funcionalidade do promotor do gene *tef1- α* . Este gene codifica o fator de alongamento da tradução 1 α e tem sido demonstrado ser eficiente e com expressão constitutiva (NEGRUTSKII & EL'SKAYA, 1998).

Em um trabalho anterior, desenvolvido em nosso grupo (FAILACE, K. dados não publicados), foi utilizada uma sonda originada do ortólogo de *Trichoderma harzianum* (MALCHER, 1997) para o isolamento do gene *tef1- α* a partir de bancos genômicos de *M. anisopliae*. Entretanto, nenhum dos clones analisados apresentava a região regulatória do gene. Assim isolamos e caracterizamos clones de cDNA do gene *tef1- α* de *M. anisopliae* e utilizamos esta informação para isolar e caracterizar o gene completo de um novo banco genômico e confirmamos a seqüência por uma clonagem independente utilizando PCR inverso (iPCR).

4.1 Isolamento e caracterização do cDNA do gene *tef1- α* de

Metarhizium anisopliae

Visando obter informações sobre o gene *tef1- α* de *M. anisopliae* que pudessem auxiliar na clonagem de sua região promotora isolamos e caracterizamos clones de cDNA. Os experimentos iniciais de “screening” do banco de cDNA foram realizados em colaboração com Karla Failace.

O “screening” do banco de cDNA de *M. anisopliae*, construído no vetor λ ZIPLOX (BRL), utilizando como sonda um fragmento de DNA de 750pb do cDNA

do gene *tef1- α* de *Trichoderma harzianum* (MALCHER, 1997), revelou sete clones positivos. Destes, três clones foram confirmados em novo “screening” e por análise do padrão de hibridização (“Southern”). Esta análise revelou a presença de um fragmento de DNA com sinal de hibridização mais forte, de 1,7Kb (Figura 1). Um dos clones (clone 3.3c, Figura 1, canaleta 7) foi completamente seqüenciado e revelou que o gene *tef1- α* de *M. anisopliae* apresenta 1.473 pb e uma seqüência deduzida de 460 aminoácidos (Figura 2). O alinhamento e a comparação da seqüência de aminoácidos com ortólogos apresentaram alto grau de similaridade, sendo de no mínimo 92% (Figura 3), principalmente quando comparada com ortólogos de fungos. Os três domínios conservados para ligação a GTP e tRNA também estão presentes no gene *tef1- α* de *M. anisopliae* (Figura 2).

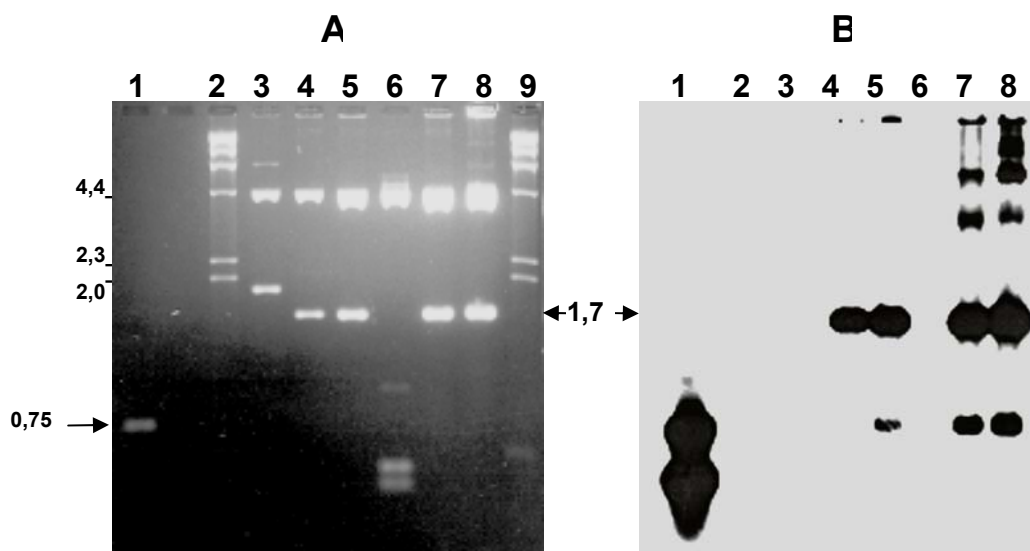


Figura 1. Análise dos clones de cDNA de *Metarhizium anisopliae*. (A) Eletroforese em gel de agarose; (B) auto-radiografia do “Southern blot”. Canaletas: (1) fragmento de 750pb do cDNA do gene *tef1- α* de *Trichoderma harzianum*; (2 e 9) marcador de tamanho molecular λ HindIII; (3) DNA do vetor plox6.1; (4) clone 1.2a, clivado com Sall e Xbal; (5) clone 2.1b, clivado com Sall e Xbal; (6) clone 2.2c, clivado com Sall e Xbal; (7) clone 3.3c, clivado com Sall e Xbal; (8) clone 3.5c, clivado com Sall e Xbal. A sonda foi marcada com o kit ECL (Amershan).

-78 cacgcggtccgatccgatctgcgaatttacactttccggtcaggacacactgcaaattctcaataatctaataccttcaaaatgggtaaggac
M G K D 4

12 gacaagactcacatcaacgtgggtcggttatcgggccagctcgactccggcaagtctaccaccactgggtcacttgatctaccagtgcggtgggt
D K T H I N V V V I G H V D S G K S T T T G H L I Y Q C G G 34

102 atcgacaagcgtaccattgaaaagttcgagaaggaagccggtgaactcggcaagggttccttcaagtacgcatgggtcttggacaagctc
I D K R T I E K F E K E A A E L G K G S F K Y A W V L D K L 64

192 aagggcggagcgtgagcgtgggtatcaccatcgacattgcctctggaagttcgagactcccaagtactatgtcaccgtcattgacgctccc
K A E R E R G I T I D I A L W K F E T P K Y Y V T V I D A P 94

282 ggtcaccgtgactttatcaagaacatgatcactgggtacttcccagggtgactgcgctatttctcattatcggtgccggtactgggtgagttc
G H R D F I K N M I T G T S Q A D C A I L I I A A G T G E F 124

372 gaggtgggtatctccaaggatggccagaccggtgagcagctctgctgcctacaccctgggtgtcaagcagctcattgtcgccatcaac
E A G I S K D G Q T R E H A L L A Y T L G V K Q L I V A I N 154

462 aagatggacaccaccaagtggtccgaggccggttaccaggaaatcatcaaggagacttccaacttcatcaagaaggtcgggtacaacccc
K M D T T K W S E A R Y Q E I I K E T S N F I K K V G Y N P 184

552 aagaccgtgccttcggtccccatctccggtttccacggtgacaacatgcttcaggcctccaccaactgccctgggtacaaggggtgggag
K T V A F V P I S G F H G D N M L Q A S T N C P W Y K G W E 214

642 aaggagaccaaggctggcaagtcaccggcaagaccctcctcgaggccattgacgccattgagcccccaagcgtcccaccgacaagccc
K E T K A G K S T G K T L L E A I D A I E P P K R P T D K P 244

732 ctccgtcttccctccaggatggtttacaagattggcgggtattggaaactgtccctgtcggccggtatcgagactgggtgtcctcaagcccggt
L R L P L Q D V Y K I G G I G T V P V G R I E T G V L K P G 274

822 atgggtcggttacctttgctccctccaacgtcaccactgaagtcaagtcgggtggaaatgcaccacgagcagcttaccgaggggtgtccccggt
M V V T F A P S N V T T E V K S V E M H H E Q L T E G V P G 304

912 gacaacggttggtttcaacgtgaagaacggtttccggtcaaggaaatccgccggtggtaacggttgctgggtgactccaagaacgacccccccatg
D N V G F N V K N V S V K E I R R G N V A G D S K N D P P M 334

1002 ggtgccgcttccttcgatgccaggtcatcggttctcaaccaccccgccaggtcgggtgctgggttacgctcccgtcctcgattgccacacc
G A A S F D A Q V I V L N H P G Q V G A G Y A P V L D C H T 364

1092 gcccacattgcctgcaagttctctgagatcaaggagaagattgaccgacgtaccggtaaggctggtgagctgtgcccccaagttcatcaag
A H I A C K F S E I K E K I D R R T G K A V E S A P K F I K 394

1182 tccggtgactctgccatcgtcaagatgggttccctccaagcctatgtgcggtgaggtttcaccgactaccctcccctgggtcggttccggtc
S G D S A I V K M V P S K P M C V E A F T D Y P P L G R F A 424

1272 gtcggtgacatgctcagaccgtcgctgtcggtgtcatcaagtcggtcgagaaggtgctgctgggtccggcaaggtcaccaagttctgct
V R D M R Q T V A V G V I K S V E K A A A G S G K V T K S A 454

1362 gcccaaggctggcaagaataagcgatcctcgagctctatagtggtgagctcgtattaggccagtgagcctaga
A K A G K K * 460

Figura 2. Sequência do cDNA do gene *tef-1α* de *M. anisopliae*. Os números, à direita indicam a posição dos aminoácidos e os à esquerda indicam a posição dos nucleotídeos. Os aminoácidos destacados em cinza representam o domínio de ligação ao GTP e em preto representam os domínios de ligação ao aminoacil-tRNA.

M. anisopliae	:	MGKDDKTHINVVVIGHVDSGKSTTTGHLIYQCGGIDKRTIEKFEKEAAELGKGSFKYAVWLDKDKAERERGITIDIALWKFETPKYVTVVIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAILIIAAG	:	120		
P. anserina	:E.....K.....	:	120		
T. reesei	:E.....	:	120		
A. oryzae	:E.Q.....K.Q.....S.....S.E.....S.....	:	120		
S. macrospora	:E.A.....K.....	:	120		
C. immitis	:EE.....K.N.....E.K.....H.....	:	120		
A. pullulans	:E-.....K.....S.....M.....	:	119		
P. angusta	:E-.....K.....H.....G.....	:	119		
S. cerevisiae	:E-.....K.....Q.....G.....	:	119		
A. glauca	:E-.....K.....H.....G.....	:	119		
M. anisopliae	:	TGEFEAGISKDGTREHALLAYTLGVKQLIVAINKMDTTKWESEARYQEIIKETSNIKKGYNPKTVAFVPIISGFHGDNMLQASTNCPWYKGWEKETKAGKSTGKTLLEAIDAIEPPKRP	:	240		
P. anserina	:N.....N.....V.G.A.....S.....	:	240		
T. reesei	:AN.A.....A.....TP.....F.....S.....	:	240		
A. oryzae	:C.D.N.....P.....N.....V.....	:	240		
S. macrospora	:Q.....K.....A.....N.....Q.....	:	240		
C. immitis	:N.P.N.....V.....A.P.....E.P.A.....N.AS.H.....D.....D.....T.....	:	240		
A. pullulans	:G.....H.P.....N.....V.....-A.....D.....S.....	:	238		
P. angusta	:VQ.....P.....N.....P.....S.VVK.....A.....	:	239		
S. cerevisiae	:	V.....V.D.S.....P.....N.....A.....VVK.....Q.S.....	:	239		
A. glauca	:V.DKN.....P.....N.....P.....S.V.....T.....	:	239		
M. anisopliae	:	TDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRIETGVLPKPGMVVTFAPSNTTEVKSVEMHHEQLTEGVPDGNVGFNVKNSVKEIRRGVAVAGDSKNDPPMGAASFDAQVIVLNHPGQVAGYAPVL	:	360		
P. anserina	:A.....	:	360		
T. reesei	:A.Q.....T.....	:	360		
A. oryzae	:	S.....A.....QA.N.....A.CD.....N.....	:	360		
S. macrospora	:A.....D.....T.....	:	360		
C. immitis	:	E.....S.....N.....K.CD.....	:	360		
A. pullulans	:	T.G.....AG.....K.CD.....	:	358		
P. angusta	:	A.....AG.....A.....C.....Q.C.....S.S.....	:	359		
S. cerevisiae	:	A.....AG.....E.....C.A.....K.C.....T.....S.S.....	:	359		
A. glauca	:	A.....AG.....A.....C.....K.CD.....S.S.....	:	359		
M. anisopliae	:	DCHTAHIACKFSEIKEKIDRRRTGKAVESAPKFIKSGDSAIVKMVPSPKPCVEAFTDYPPLGRFAVRDMRQTVAVGVKISVEKAAA-GSGKVTKSAAKAGKK-	:	460	I (%)	S (%)
P. anserina	:L.....ES.....A.....E.....K.....-.....-.....-.....-.....	:	460	95	98
T. reesei	:A.L.....T.....A.....SS-AAA.....A.....-.....	:	460	94	96
A. oryzae	:A.L.....S.DK.....A.....S.....NTG.....A.Q.....-.....	:	460	88	95
S. macrospora	:A.L.....S.....A.....A.D.TQ.-VA.....A.....-.....	:	460	93	97
C. immitis	:L.....S.NN.....A.....SEK-TG.....A.Q.....A.....-.....	:	460	88	93
A. pullulans	:V.....S.A.....A.....A.SDKQ.A.....A.V.....-.....	:	459	90	95
P. angusta	:D.L.....K.EN.....A.....T.E.....T.-A.....A.Q.A.....-.....	:	459	86	94
S. cerevisiae	:D.L.N.....K.DH.....A.....F.....E.....D.TEK--AA.....A.Q.A.....-.....	:	458	85	92
A. glauca	:DT.V.....K.EN.....A.....SDK--A.....A.Q.A.....-.....	:	458	87	93

Figura 3. Comparação da seqüência de aminoácidos do gene *tef-1α* de *M. anisopliae* com ortólogos de fungos. Alinhamento realizado com o programa ClustalX (PAM250). Ponto: resíduos idênticos; traço: inserção; I: identidade; S: similaridade.

4.2 Isolamento e caracterização do gene *tef1-α* de *Metarhizium anisopliae*

Para a clonagem do gene *tef1-α* (genômico) construímos e utilizamos um novo banco de genes. Este banco foi construído utilizando o vetor LambdaGen11 (Promega). Este vetor é um derivado do vetor λEMBL3 e apresenta sítios simétricos para as enzimas de restrição *SacI*, *XhoI* e *BamHI*.

O banco foi construído utilizando fragmentos de DNA genômico de *M. anisopliae* cepa E6 entre 15 a 20 Kb. O título original do banco era de 6×10^3 ufp/mL, que representa, aproximadamente, três vezes o genoma do fungo estimado em 30 Mb (VALADARES-INGLIS & PEBERDY, 1998). O banco genômico foi amplificado para um título de 8×10^6 ufp/mL.

Para o "screening" foram utilizadas 4×10^4 UFP do banco amplificado e foi utilizado como sonda o fragmento de DNA de 0,45 kb oriundo de digestão de um clone genômico (em λEMBL3) previamente isolado e caracterizado por sequenciamento (NAKAZATO *et al.*, 2002). Este fragmento de DNA corresponde a uma região interna do gene *tef1-α* de *M. anisopliae* cuja posição está representada na Figura 7.

Obtivemos neste "screening", quatro clones que hibridizaram com a sonda. O mapeamento de sítios para enzimas de restrição e a análise por "Southern" demonstrou que todos os clones contêm regiões idênticas do genoma de *M. anisopliae*. Destes, três clones apresentaram padrão de sinal de hibridização similar e apenas um diferente (Figura 4).

O clone D foi selecionado para a realização de análise de restrição e hibridização (Figura 4). A subclonagem do inserto do clone D foi realizada

utilizando-se fragmentos de DNA originados na digestão simples ou dupla com as enzimas Sall e XhoI.

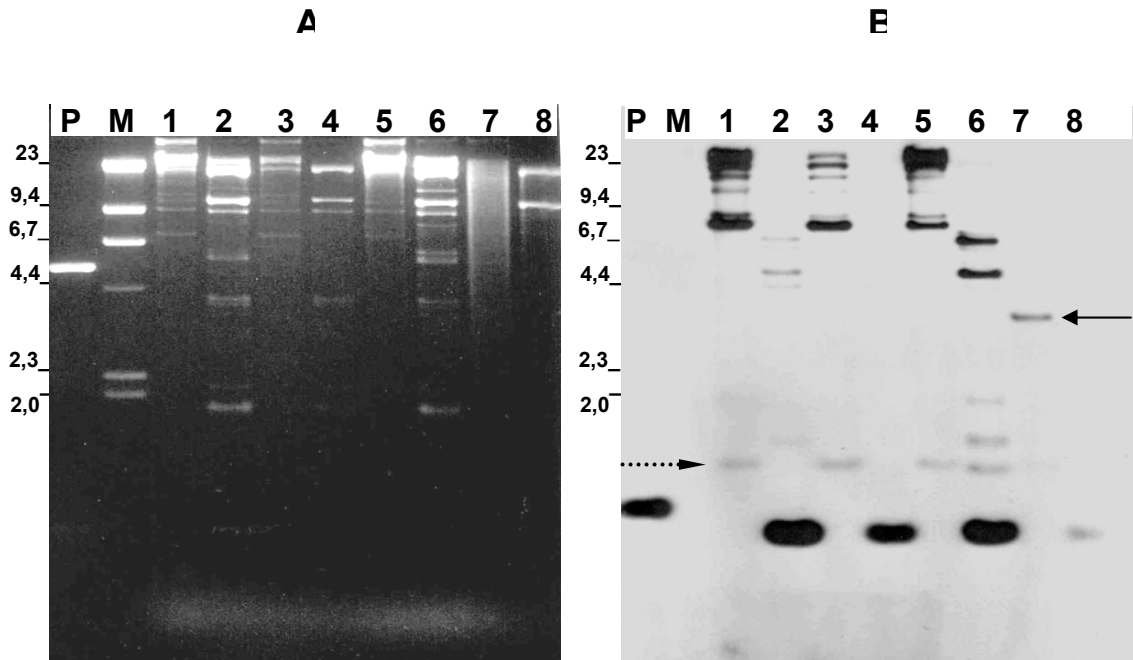


Figura 4. Padrão de hibridização de clones genômicos de *tef-1α* de *M. anisopliae*. Painel (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. DNA dos clones A, D, E e J foi digerido com as enzimas de restrição Sall ou XhoI. Painel (B) autoradiografia utilizando como sonda um fragmento de cDNA de 0,45Kb. Canaletas. (P):clone cDNA *tef-1α* de *M. anisopliae*; (M) marcador de tamanho molecular (λ /HindIII); (1) clone A/Sall; (2) clone A/XhoI; (3) clone D/Sall; (4) clone D/XhoI; (5) clone E/Sall; (6) clone E/XhoI; (7) clone J/Sall; (8) clone J/XhoI. A seta tracejada indica bandas de hibridização similares nos clones A, D e E; e a seta continua indica sinal de hibridização único no clone J.

O sequenciamento dos subclones gerados com fragmentos de DNA obtidos por clivagem com as enzimas XhoI, Sall e Sall / XhoI, mostrou a ausência da região promotora nestes clones. Retornamos a hibridização com o clone genômico D digerido com as enzimas EcoRI e Sall e utilizamos como sonda (S1) a região 5' não traduzida (UTR) juntamente com o início da região codificadora do clone de cDNA digerido com Sall (Figura 5). O fragmento de DNA com sinal de hibridização mais forte de 0,8 kb (Figura 5) foi subclonado no vetor pUC18 (digerido com Sall e EcoRI) e, posteriormente, seqüenciado (Figura 6). Este fragmento de DNA de 0,8 kb contém os 15 primeiros aminoácidos do fator de tradução TEF1- α e apresenta algumas seqüências regulatórias potenciais, identificadas por análise *in silico* (Figura 6), porém sem a presença de seqüências de consenso para *TATAbox* e *CAATbox*.

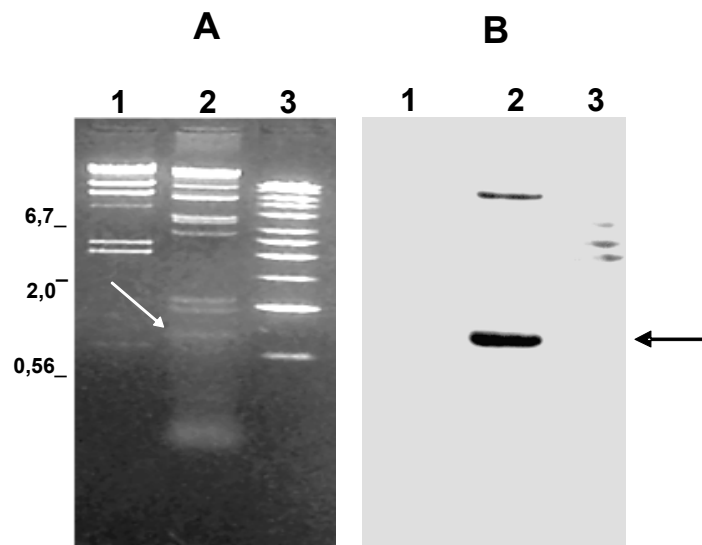


Figura 5. Padrão de hibridização do clone D genômico (no vetor LambdaGem-11). Painel (A): Eletroforese em gel de agarose. Painel (B) autoradiografia da hibridização utilizando-se como sonda o fragmento de 0,15Kb do gene *tef-1 α* . Canaletas (1): marcador de tamanho molecular λ /HindIII; (2) clone D digerido com EcoRI e Sall; (3) marcador Kilobase (Pharmacia). Os números a esquerda representam o tamanho em kb. As setas indicam o fragmento de DNA que corresponde a região promotora do gene *tef-1 α* .

1 AGAATGATACGAATCGCATCCTATAGCTTTCCTCACTTGTGCATCACCGT
 (-)H2A_conservado_U
 (+)GATA-1

51 GGCTTTGTTCGTTTCCAAGGGCAGCCTTGATGCAAACCTCAACGGCCTCTT
 (-)PEA3
 (+)Myb

101 TGCCCCCTCCAAGGCTCGCCCGTCATCGTGACCAGGTGAACTGGTAGTAAA
 151 GGACTCCTAGGTACATCTGGTACATGACGAAGCACCGGGCCAAGGCCAGG
 (+)P2I

201 ACGCTGATTGGCTTGCGCCACCCGCACAACATGGCGCTAAAAGGCGAAAAA
 (-)H2B-CCAAT
 (+)CBF
 (+)CDF

251 AAAAAATCTTGCAGTGAAGTCTTTGGTGCAGCCCAGAGGGGAGAAAAAACTT
 301 CTGGCCTGTTAGGGCTAGCTGGTCAAAGTGGTCTCCCCTCGTTGCTCTGT
 351 TGCCCCGCGCCGCAGCCAGCATCAGTCACTCCACCCCTCCTCCACTCATC
 401 TTTTTTAAATCTCCTCCTCCACCACCTCTTTGCGAATTTTTCTCTCTTT
 451 TCGCTCCTCGTCTCGCATACCCGGTTCAAGCATCCGATCTGCGAATTTGT
 501 AAGTTGGTCTCATCAACAATCCTCTTCTTCATCAACATCATTGATGCAG
 551 ACGGATGGAAGATATCAGCTGCTGACTCTTTTGACAAGACACTTCCGTC
 601 AGGACACACTGCAAATCTCAATAATCTAATACCTTCAAAATCGGTAAGGA
 651 CGACAAGACTCACATCAACGTGGTTCGTTATCGTAAGTCGCCTGCCTTCAT

Figura 6. Seqüência da provável região promotora do gene *tef-1 α* de *Metarhizium anisopliae* com possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição (Signal Scan: <http://thr.cit.nih.gov/molbio/signal/>). Sombreado em preto está representado o códon inicial da proteína TEF1- α . Os sinais (+) e (-) representam a fita senso ou anti-senso, respectivamente. As seqüências sublinhadas são os primers PTEFforward e PTEFreverse, respectivamente.

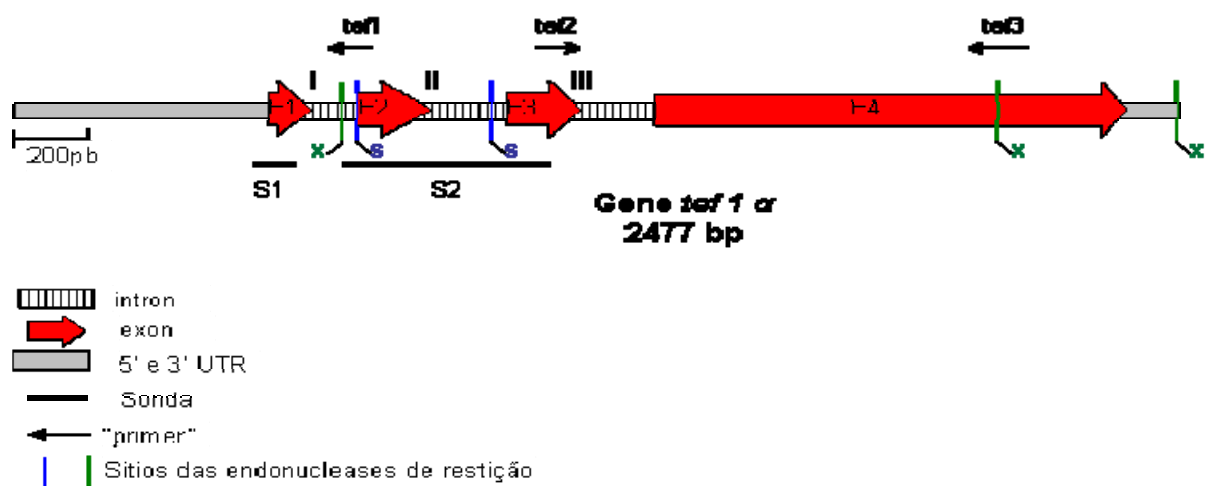


Figura 7. Mapa físico do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae*. S1 e S2 representam as sondas de 0,1 e 0,45 Kb, respectivamente. Os primers *tef1* e *tef2* foram utilizados no iPCR e *tef2* e *tef3* em RT-PCR. Os sítios das endonucleases de restrição *Sall* e *XhoI* estão representados por S e X, respectivamente.

Devido à dificuldade de clonar a provável região regulatória 5' do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* e para certificar a exatidão da seqüência no genoma, paralelamente ao “screening” genômico, realizou-se a clonagem da mesma região do gene utilizando uma estratégia alternativa de PCR inverso (iPCR). Para determinar a enzima de restrição a ser utilizada, inicialmente, realizou-se uma hibridização de DNA genômico de *M. anisopliae* digerido com as enzimas EcoRI, HindIII, Sall e Xbal (Figura 8), utilizando como sonda o fragmento de DNA de 0,45Kb (S2) do clone genômico (Figura 7). Devido ao sinal de hibridização de aproximadamente 3Kb, obtido na digestão do DNA genômico com a enzima EcoRI, a digestão com esta enzima foi utilizada para o iPCR. O produto da amplificação do iPCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose, observando-se uma banda de aproximadamente 2,9kb, a qual foi submetida à hibridização, utilizando-se a sonda de 0,15Kb (S1) (Figura 9). Este fragmento de DNA foi subclonado em vetor pUC18 e submetido ao sequenciamento com os oligonucleotídeos TEF1 e TEF2 (Figura 7), e a seqüência foi confirmada como sendo a mesma obtida no clone do “screening” genômico.

O gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* apresenta 2.477pb (acesso Genbank AY445082), e está dividido em 4 éxons e 3 íntrons (Figuras 7 e 10). As seqüências consenso para “splicing” estão presentes nas regiões entre éxons e íntrons. Neste estudo, considerou-se como região promotora os 639 pb à montante do sitio de inicio da tradução. Esta região não apresentou elementos conservados TATA box ou CAAT box identificáveis por análise da seqüência (Figura 6).

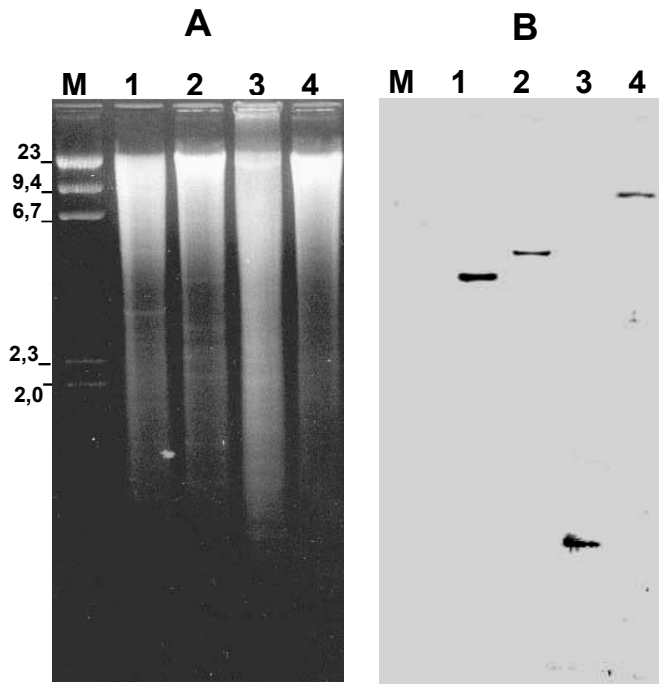


Figura 8. Padrão de hibridização do gene *tef-1α* de *M. anisopliae*. Painel (A): Eletroforese em gel de agarose, fracionamento do DNA da cepa E6 (5µg). Painel (B) auto-radiografia da hibridização utilizando fragmento genômico 0,45 Kb do gene *tef-1α* de *M. anisopliae* marcado pelo kit ECL (Amershan). Canaletas: (M) marcador de tamanho molecular λ HindIII; (1) DNA E6 digerido com EcoRI; (2) DNA E6 digerido com HindIII; (3) DNA E6 digerido com Sall; (4) DNA E6 digerido com XbaI. Os números a esquerda representam o tamanho em kb.

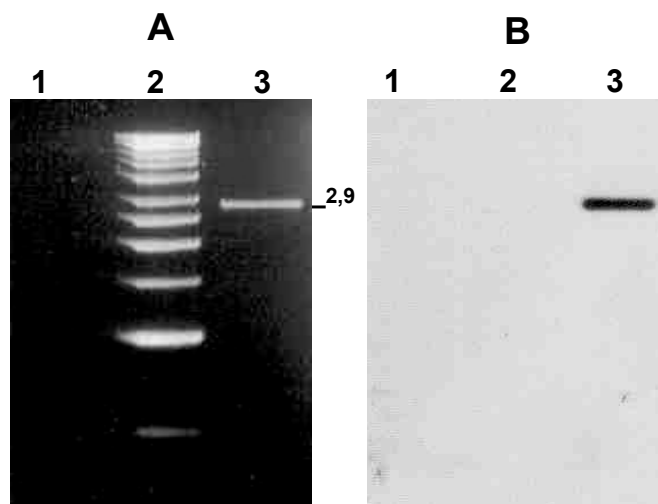


Figura 9. Amplificação de fragmento *tef-1α* de *M. anisopliae* por iPCR. Painel (A): Eletroforese em gel de agarose. Painel (B) auto-radiografia da hibridização utilizando como sonda (S1) a região 5' terminal do cDNA de *tef-1α* de *M. anisopliae* marcado pelo kit ECL(Amershan). Canaletas: (1) Controle negativo do iPCR, sem DNA molde; (2) marcador de tamanho molecular Kilobase (Amershan); (3) produto do iPCR.

```

agaatgatacgaatcgatcctatagcttttctcacttgtgcatcaccgtggcttttgcgtttccaagggcagccttgatgcaaacctcaacggcctctt 100
tgccccccaaggctcgcccgcctcgtgaccaggtgaactggtagtaaggactcctaggtacatctggtacatgacgaagcaccgggccaaggccagg 200
acgctgattggccttgcccaccgcacaacatggcgctaaaaggcgaaaaaaatcttgcgagtgactttggtgagccagagggggagaaaaaactt 300
ctggcctgttagggctagctggtcaagtgggtcctccctcgttgcctctgttgcctccgcgcagccagcatcagtcactcccccctcctcactcatc 400
ttttttaaactcctcctcccaccactctttgcgaatttttctctcttttcgctcctcgtctcgcatacccgggtcaagcatccgatctgcgaatttgt 500
aagtggctcctcatcaacaatcctcttctcctcaacatcattgatgcagacggatggaagatatcagctgctgactcttttgacaagacactttccgctc 600
aggacacactgcaaatctcaataatctaataccttcaaaATGGGTAAGGACGACAAGACTCACATCAACGTGGTCGTTATCgtaagtcgctgccttcat 700
                                     M G K D D K T H I N V V V I                                     14
ttcgaactttgtagaagctgttatactgacttgccttgcgtgtaggggtatggttcggagcctacacttttcgcccgtctcagatgttgtgataacctgactgg 800
cctcacagGGCCACGTGACTCCGGCAAGTCTACCACCCTGGTCACTTGTATCTACCAGTCCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAA 900
      G H V D S G K S T T T G H L I Y Q C G G I D K R T I E K F E K 55
Ggtaagccaaccactccgattaatgatctgctattggttggcgatgaacattattgggtttcccgcctgctgcggccattaccctcactgtgacacga 1000
aaattttcgcccccttatcttggactttggtggggcaccatacccgcagctgctgaggggtgctcctgctctctctggtggtgaaaccacaata 1100
tgctgctgctttcagagaaaaaacagaaactaacttggatcgctgtagGAAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCTTCAAGTACGCATGGGTTCTTG 1200
                                     E A A E L G K G S F K Y A W V L                                     71
ACAAGCTCAAGCGCGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGgtatgtcgac 1300
D K L K A E R E R G I T I D I A L W K F E T P K Y Y V T V I                                     91
tgcgcaaacgagcactacttttctcccaaatgaatgctaatagcccctcccacagACGCTCCCGGTACCGTGACTTTTATCAAGAACATGACTACTGGTAC 1400
                                     D A P G H R D F I K N M I T G T                                     107
TTCCAGGCTGACTGCGCTATTCTCATTATCGCTGCCGGTACTGGTGGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCCGTGGCAGCGCTCTGCTC 1500
      S Q A D C A I L I I A A G T G E F E A G I S K D G Q T R E H A L L 140
GCCTACACCTGGGTGTCAAGCAGCTCATTGTGCCATCAACAAGTGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTT 1600
A Y T L G V K Q L I V A I N K M D T T K W S E A R Y Q E I I K E T 173
CCAACCTCATCAAGAAGGTTCGGCTACAACCCCAAGACCGTGCCTCTCGTCCCATCTCCGGTTTCCACGGTGACAACATGCTTCAGGCCCTCCACCAACTG 1700
S N F I K K V G Y N P K T V A F V P I S G F H G D N M L Q A S T N C 207
CCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCACCGGCAAGACCCCTCTCGAGGCCATTGAGCCCCCAAGCGTCCC 1800
      P W Y K G W E K E T K A G K S T G K T L L E A I D A I E P P K R P 240
ACCGACAAGCCCCTCCGCTTCCCTCCAGGATGTTTACAAGATTGGCGGTATTGGAAGTGTCCCTGTGCGCCGATATCGAGACTGGTGTCTCAAGCCCG 1900
      T D K P L R L P L Q D V Y K I G G I G T V P V G R I E T G V L K P 273
GTATGGTGGTTACCTTTGCTCCCTCCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTGGAAATGCACCACGAGCAGCTTACCAGGGTGTCCCGGTGACAACGT 2000
G M V V T F A P S N V T T E V K S V E M H H E Q L T E G V P G D N V 307
TGTTTCAACGTGAAGAAGCTTCCGTCAGGAAATCCGCCGTGGTAACGTTGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCATGGGTGCCGCTTCTTCGAT 2100
      G F N V K N V S V K E I R R G N V A G D S K N D P P M G A A S F D 340
GCCCAGGTCATCGTTCTCAACCACCCCGCCAGGTCCGTTGCTGGTTACGCTCCCGTCTCGATTGCCACACCGCCACATTGCCTGCAAGTTCTCTGAGA 2200
A Q V I V L N H P G Q V G A G Y A P V L D C H T A H I A C K F S E 373
TCAAGGAGAAGATTGACCGACGTACCGTAAGGCTGTGAGTCTGCCCCCAAGTTTCAAGTCCGGTACTGTCATCGTCAAGATGGTTCCCTCCAA 2300
I K E K I D R R T G K A V E S A P K F I K S G D S A I V K M V P S K 407
GCCTATGTGCGTTGAGGCTTTCACCGACTACCTCCCTGGGTGCTTTCGCGTCCGTGACATGCGTCAGACCGTCCGCTGTGCGGTGTCATCAAGTCCGTC 2400
      P M C V E A F T D Y P P L G R F A V R D M R Q T V A V G V I K S V 440
GAGAAGGCTGCTGCTGGTCCGGCAAGGTCACCAAGTCTGTGCCAAGGCTGGCAAGAAATAAGCGATCTCGAGCT 2477
E K A A A G S G K V T K S A A K A G K K * 460

```

Figura 10. Gene *tef-1α* de *M. anisopliae*. As letras minúsculas representam regiões não codificadoras ou íntrons. As letras maiúsculas representam seqüências codificadoras (éxons). As letras maiúsculas em negritos representam resíduos de aminoácido. (Genbank AY445082)

4.3 Análise filogenética de genes orthologos a *tef1- α*

O gene *tef-1 α* tem sido utilizado em diversos organismos como modelo para análises filogenéticas, em conjunto com genes ribossomais 5.8S, 28S e seqüências transcritas internas para genes ribossomais (ITS1 e ITS2) (DRIVER et al., 2000). O fungo *Metarhizium anisopliae*, entretanto, apresenta dificuldades na classificação taxonomia devido à ausência da sua forma sexuada (ROBERTS & ST LEGER, 2004). O fungo *Cordyceps brittlebankisoides* apresentou uma forma teleomórfica identificada como *Metarhizium anisopliae* var. *majus*, entretanto o tamanho dos esporos são menores do que os descritos para esta variedade (Liu et al., 2000). A utilização do gene *tef-1 α* para a montagem de uma árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos indicaria a possível relação com outras espécies de fungos.

A árvore filogenética agrupa *M. anisopliae* E6 no mesmo ramo que *M. anisopliae* ARSEF e *Cordyceps taii*. Uma ramificação anterior indica o agrupamento de *M. anisopliae* E6 com fungos da família *Clavicipitaceae*, principalmente os gêneros *Epicloe* sp e *Claviceps* sp (Figura 11).

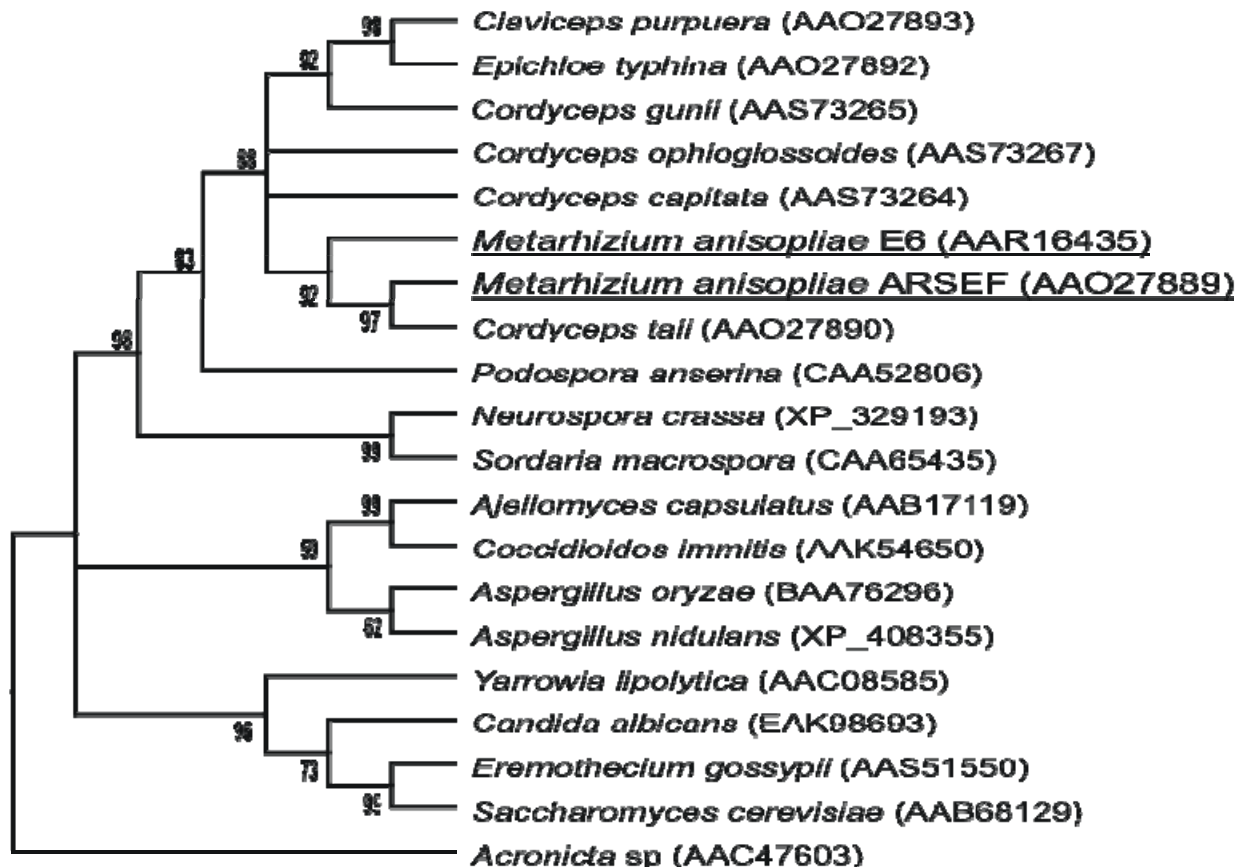


Figura 11. Análise filogenética de genes ortólogos a *tef1-α*. Os resíduos de aminoácidos foram alinhados pelo programa ClustalX. O programa MEGA2 foi utilizado e a árvore filogenética foi baseada no método NJ (correção de Poisson) com 10.000 “bootstraps”. Os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses. As duas linhagens de *M. anisopliae* apresentam-se sublinhadas.

4.4 Análise da expressão do gene *tef-1 α* de *Metarhizium anisopliae*.

A utilização de promotores de genes, que apresentam expressão constitutiva, é um passo essencial na construção de vetores de expressão. Para avaliar a regulação em nível de transcrição do promotor do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* em relação ao seu estágio de desenvolvimento e fontes de carbono e nitrogênio, realizamos experimentos de “Northern blot”.

RNAs extraídos de micélio cultivado em meio MM (Apêndice 1) acrescido de 1% de glicose ou de 1% de cutícula de carrapato foram hibridizados com o fragmento de 0,4 Kb do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* como sonda. A Figura 12 mostra que o gene está expresso nas duas condições. Este fato também foi observado quando se analisou a expressão em conídios e micélio cultivado por 12h, 24h, 36h e 48h (Figura 12), indicando um nível de expressão constitutivo em todos os tempos.

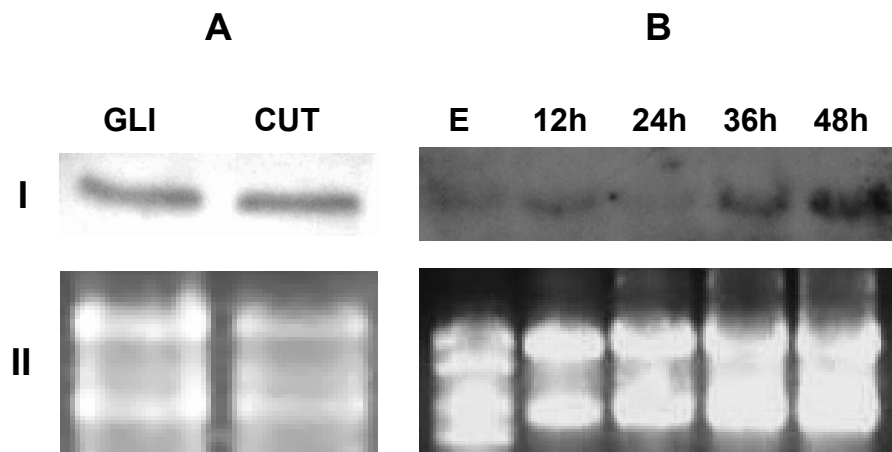


Figura 12. Análise da expressão do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* Painel (A) “Northern blot” utilizando RNA total de micélio cultivado por 24h em meio MM acrescido de glicose (GLI) ou cutícula (CUT). . Painel (B) “Northern blot” utilizando diferentes estágios de desenvolvimento do fungo. (I): auto-radiografia utilizando-se como sonda não radioativa um fragmento de 0,4 kb do gene *tef-1 α* ; (II): gel de agarose corado com brometo de etídio.

4.5 Construção de um vetor de expressão para *M. anisopliae*

Para avaliar a eficiência do promotor *tef-1 α* de *M. anisopliae* foram construídos os vetores pTEFGFP e pGFP (Figura 13). Os plasmídeos foram construídos com base no vetor pUC18 e utilizando-se a região promotora do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae*, exceto no plasmídeo pGFP (controle negativo), e a região terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (FERNANDEZ-ABALOS *et al.*, 1998). A região de 0,65kb que contem o promotor do gene *tef-1 α* foi amplificada através de PCR com *primers* específicos, contendo sítios, na porção 5' terminal, para as enzimas EcoRI e KpnI (Apêndice 2). O gene *gfp* mutante (sGFP2) de *Aequoria vitória* foi obtida através da amplificação do plasmídeo pANsGFP2 (FERNANDEZ-ABALOS *et al.*, 1998), utilizando *primers* com sítios, na porção 5' terminal, para as enzimas KpnI e BamHI (Apêndice 2).

Inicialmente, os protoplastos foram co-transformados com o plasmídeo pBT6, que confere resistência à droga benomil (ORBACH *et al.*, 1986), como marca de seleção para os transformantes de pTEFGFP ou pGFP. Os possíveis transformantes (ben^R) indicaram apenas a presença do plasmídeo de seleção pBT6 e sem fluorescência.

Posteriormente, como alternativa utilizou-se a marca de seleção do gene *bar*, presente no plasmídeo pANBAR (STAATS, 2004), o qual foi inserido nos plasmídeos pTEFGFP e pGFP utilizando-se o sítio da enzima PstI e confirmados através de sequenciamento.

Esta marca se mostrou mais eficiente e de fácil análise dos transformantes, conforme descrito por STAATS (2004). Os transformantes foram obtidos através da metodologia de protoplastos tratados com PEG/CaCl₂ (BOGO *et al.*, 1996) e foram repicados em meio seletivo com glifosinato de amônio por 4 gerações, no mínimo, para selecionar transformantes estáveis. Em paralelo, para testar a

estabilidade fenotípica, os transformantes foram repicados duas vezes em meio sem a marca de seleção e, posteriormente, em meio contendo glifosinato de amônio.

A confirmação molecular dos transformantes foi realizada em 4 transformantes de pTEFGFP (T_1 , T_2 , T_3 e T_4) por “Southern blot” (item 3.8.1) utilizando-se como sonda somente a seqüência do gene sGFP2 de 0,7 Kb (“ECL Direct™ Nucleic Acid Labeling and Detection Systems” (Amersham Biosciences) (Figura 13). O padrão de hibridização indica a presença de inserções simples (T_1 , T_3 e T_4) ou múltiplas (T_2) e possivelmente em diferentes regiões do genoma devido à sinais de hibridização de diferentes tamanhos moleculares (Figura 14).

Todos os transformantes contendo o vetor pTEFGFP apresentaram-se fluorescentes quando analisados em microscopia de epifluorescência, demonstrando que a seqüência *PtefMa* funciona como promotor. Os transformantes obtidos com o vetor controle pGFP não apresentaram fluorescência.

A fluorescência em todos os transformantes de pTEFGFP foi observada em diversas fases do desenvolvimento desde esporos, tubos germinativos e micélio (Figura 15). Este resultado sugere que o promotor, como esperado, é constitutivo, e funcional e produz uma quantidade detectável de GFP independente da fase desenvolvimento. A fluorescência manteve-se após dois repiques em meio não seletivo, indicando que a inserção genômica é estável.

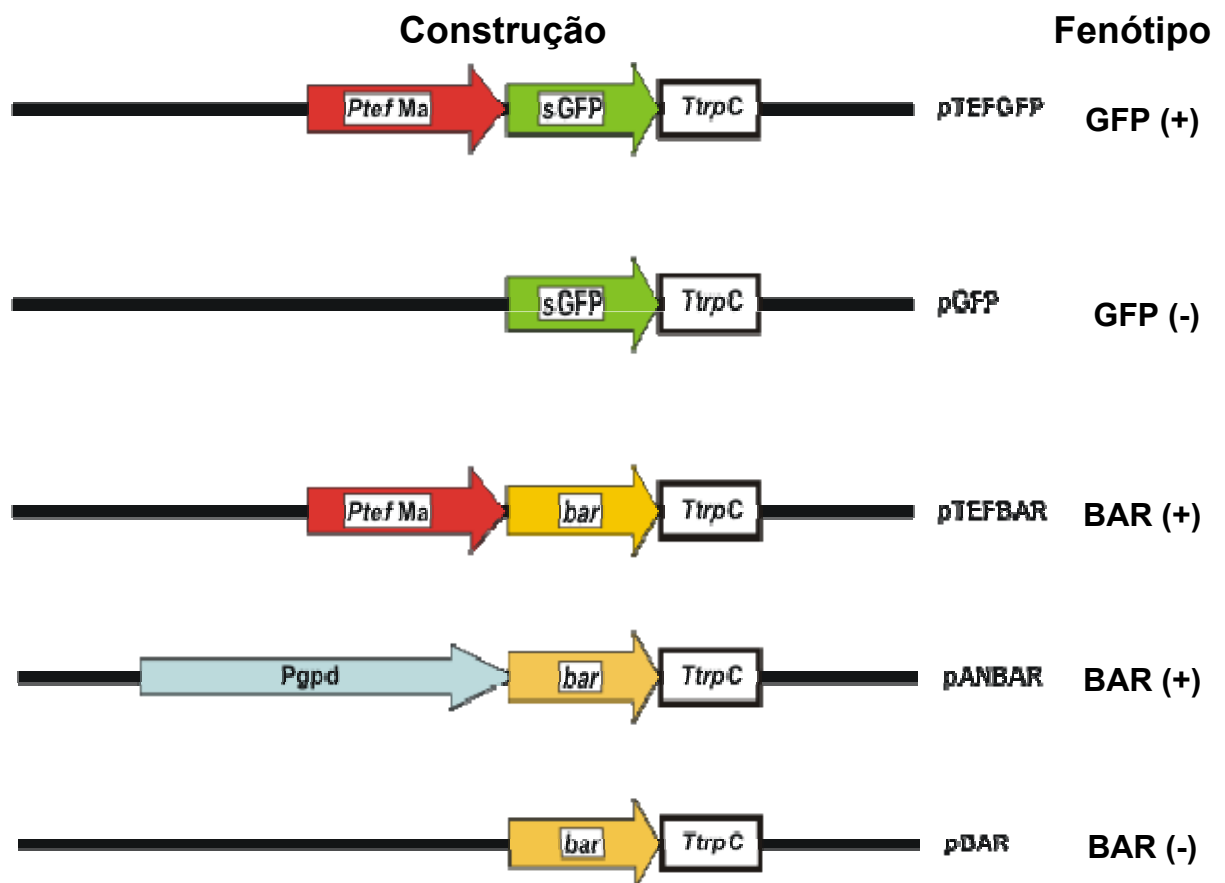


Figura 13. Vetores utilizados para testar a funcionalidade do promotor *PtefMa*. Os sítios das enzimas de restrição estão representados por letras. E: Eco RI; K: KpnI; B: BamHI; P: PstI; H: HindIII; N: NcoI. *PtefMa*: provável região promotora do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae*; *PgpdA*: região promotora do gene *gpdhA* de *A. nidulans*; sGFP: gene da proteína verde fluorescente de *A. victoria*; *bar*: gene de resistência a glifosinato de amônio de *S. hygroscopicus*; *Ttrpc*: região terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans*. (+) e (-)

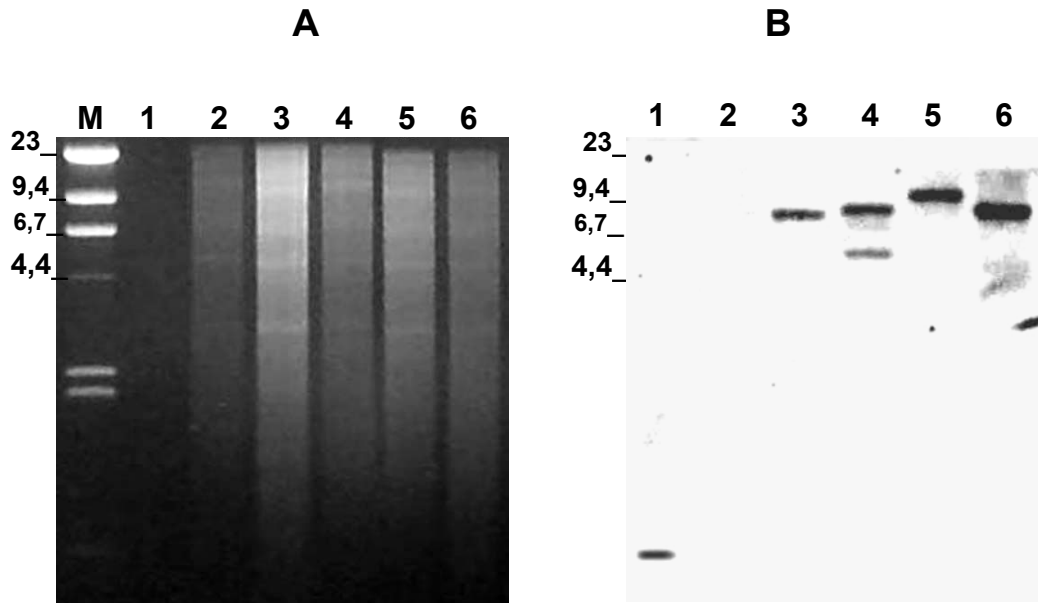


Figura 14. Análise dos transformantes de *Metarhizium anisopliae* com o plasmídeo pTEFGFP. (A): fracionamento do DNA digerido com EcoRI em gel de agarose 0,8%. (B) auto-radiografia utilizando-se como sonda um fragmento de 0,7Kb do gene *gfp* com marcação não radioativa através do kit Gene Images. (M): marcador tamanho molecular λ /HindIII; (1) sonda; (2): *M. anisopliae* E6; transformantes (3): T1; (4): T2; (5): T3; (6): T4.

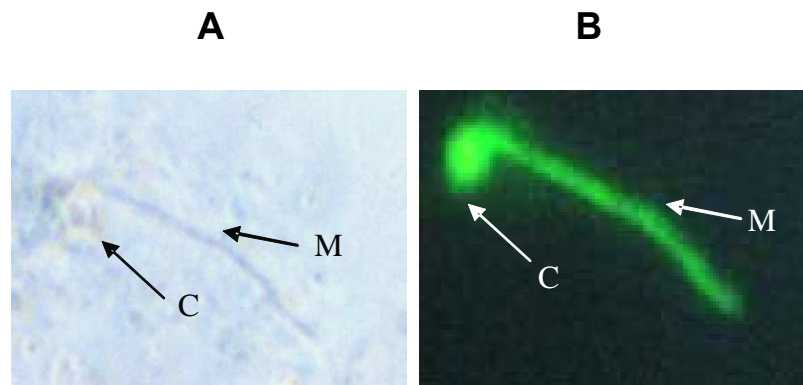


Figura 15. Análise dos transformantes de *Metarhizium anisopliae* expressando GFP. O fungo foi cultivado por 12h em meio MCc. Painel A: visualização em microscópio de epifluorescência em campo claro; Painel B: visualização do mesmo campo (A) com luz fluorescente com filtros de absorção (450-490nm) e emissão (520nm). Aumento de 1000 vezes, micrografias com filme kodak iso 400, 4s.

A eficiência de transformação também foi avaliada em relação à resistência ao glifosinato de amônio. Para isto transformou-se protoplastos com os plasmídeos pTEFBAR, pANBAR e pBAR (controle negativo), conforme Tabela 2. Embora o número de transformantes obtidos com o plasmídeo pTEFBAR foi igual ou superior ao obtido com o plasmídeo pANBAR, ocorreu um grande variação entre as repetições indicando uma maior influência da técnica de transformação do que influência do plasmídeo.

Tabela 2. Comparação do promotor de *Ptef* de *Metarhizium anisopliae* e *PgpdA* de *Aspergillus nidulans* na eficiência de transformação. Seleção por expressão do gene *bar*.

<i>Plasmídeo</i>	N° de transformantes/plasmídeo (50µg)	
	<i>Repetição 1</i>	<i>Repetição 2</i>
pTEFBAR	8	1
pANBAR	1	1
pBAR	0	0

4.6 Bioensaio dos transformantes

Com o objetivo de avaliar alteração na patogenicidade dos transformantes que apresentam vetores contendo o promotor *tef-1α* de *M. anisopliae* foram realizados bioensaios em *Boophilus microplus*.

Suspensões de esporos dos transformantes T1 (com uma cópia de pTEFGFP integrada no genoma) e G2 (com uma cópia do pGFP no genoma), foram avaliados quanto a patogenicidade para o carrapato *B. microplus*. Como controle positivo utilizou-se *M. anisopliae* linhagem E6 e água destilada estéril como controle negativo (sem inóculo).

Os dados dos bioensaios estão sumarizados na Figura 16. Não se observou diferença significativa em relação ao número de mortes de teleóginas

entre os transformantes e a cepa selvagem. Somente ocorreram diferenças significativas no número de mortes de teleóginas entre o controle negativo (sem inóculo) e os tratamentos com esporos da linhagem selvagem (E6) ou dos transformantes (T1 e G2). O transformante T1, que expressa GFP sob controle do promotor *PtefMa*, apresentou intensa fluorescência, em teleóginas infectadas, em todas fases de desenvolvimento do fungo (Figura 17).

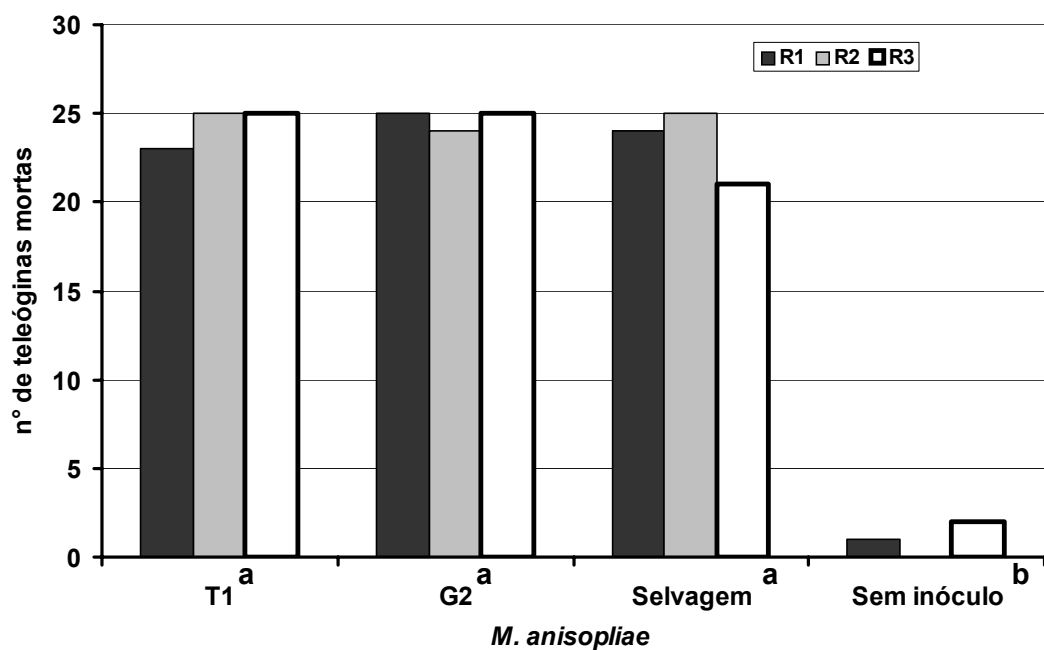


Figura 16. Bioensaios em *Boophilus microplus* comparando a patogenicidade dos transformantes (T1 e G2) e a cepa selvagem durante 10 dias. O bioensaio foi realizado em triplicata (R1, R2 e R3) com 25 teleóginas em cada grupo. As linhagens com letras idênticas não apresentaram diferença significativa ($P < 0,01$).

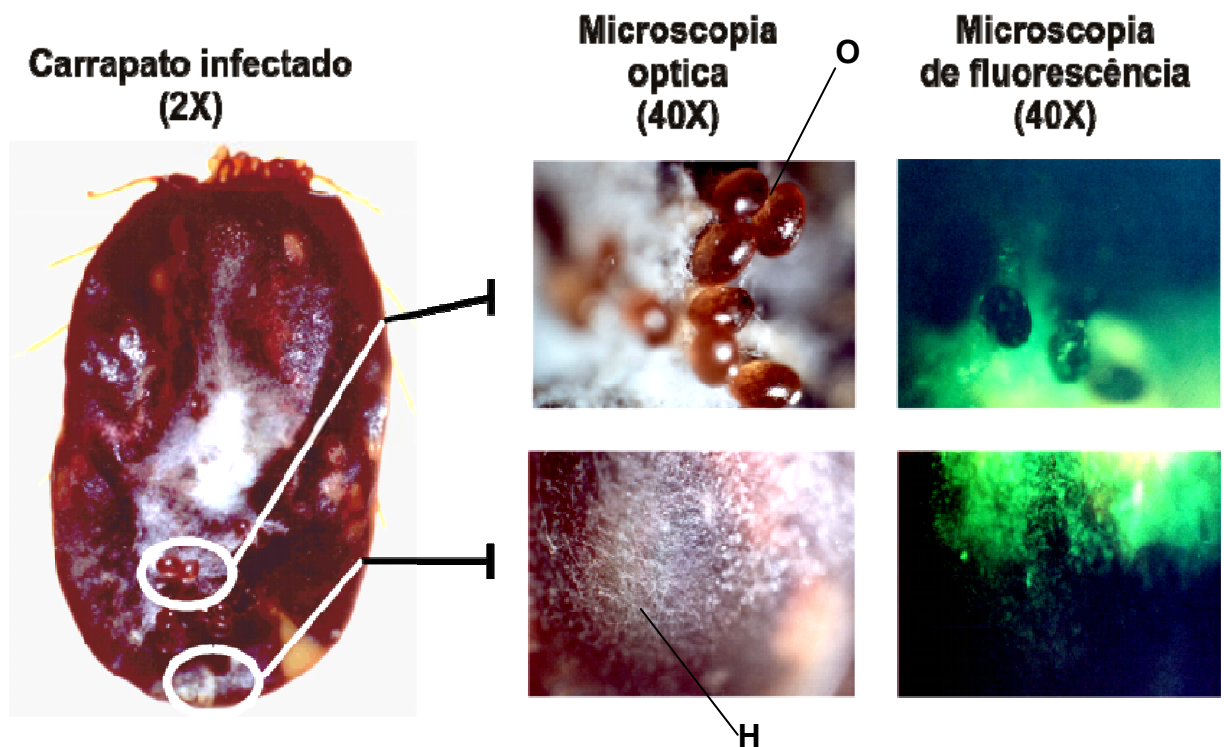


Figura 17. Expressão de GFP sob controle do promotor *PtefMa* (transformante T1) durante a infecção do carrapato *Boophilus microplus*. A: Visão macroscópica de *B. microplus* infectado pelo transformante T1; B: microscopia óptica, campo claro; C: mesmo campo de B sob fluorescência (excitação 450/490nm e emissão 510nm); O: ovos de *B. microplus*; H: hifas de *M. anisopliae*.

5 Discussão

O desenvolvimento e a aplicação de metodologias de isolamento de genes, em especial aquelas com capacidade de isolar genes com expressão diferencial e os projetos de sequenciamento de ESTs, tem disponibilizado um número crescente de genes com potencial envolvimento nos mecanismos moleculares de diferentes processos biológicos (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004; FREIMOSER *et al.*, 2005). Embora esses genes, normalmente, tenham a sua expressão caracterizada pela análise dos transcritos, por “Northern”, RT-PCR ou “Northern” virtual, a prova efetiva da sua função requer a interferência direta com a sua expressão *in vivo* e análise do fenótipo alterado (HU *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2005).

Basicamente os enfoques aplicados na descoberta / comprovação da função de genes isolados, têm sido a superexpressão (ST LEGER *et al.*, 1996; HU *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2005), a inativação do gene por interrupção da sua seqüência (ARONSON *et al.*, 1994; MORALEJO *et al.*, 2002) a introdução de cópias anti-senso (MORALEJO *et al.*, 2002; DE BACKER *et al.*, 2002) ou, mais recentemente, a utilização de RNA de interferência (RNAi) (AGRAWAL *et al.*, 2003; SOMMER *et al.*, 2003; KADOTANI *et al.*, 2003; GOLDONI *et al.*, 2004). Essas metodologias tem sido aplicadas também a fungos filamentosos (KADOTANI *et al.*, 2003). Algumas limitações como a baixa eficiência de transformação, o silenciamento de cópias gênicas (COGONI *et al.*, 1996), a complexidade dos mecanismos, pouco conhecidos, de recombinação e a limitação de marcas de seleção para experimentos de bloqueio da função gênica, tem dificultado os avanços com estes organismos (MULLINS & KANG *et al.*, 2001). Além disso, em linhagens haplóides, no caso do bloqueio do gene em

estudo ser letal, o bloqueio de função não pode ser aplicado. Mais recentemente, metodologias de RNAi tem sido desenvolvidas para fungos filamentosos mas a sua aplicação ainda se restringe aos modelos de estudo mais utilizados, *Neurospora*, *Saccharomyces* e *Magnaporthe* (CHICAS *et al.*, 2004; NAKAYASHIKI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005). Assim, a estratégia ainda com aplicação mais ampla é a superexpressão do gene em estudo e a análise do fenótipo alterado.

O Reino dos fungos compreende alguns dos organismos mais ubíquos e com a maior plasticidade bioquímica na natureza. Disso decorre, e comprova, o seu amplo uso em processos biotecnológicos (BENNETT, 1998; MORENO *et al.*, 2004). Assim, uma variedade de antibióticos, drogas anti-neoplásicas, enzimas, vitaminas, aminoácidos entre outros são produzidos por fungos em escala industrial (BENNETT, 1998; PUNT *et al.*, 2002; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Raramente, estas características desejáveis são encontradas em todos os gêneros ou espécies, mas sim, normalmente, em alguns isolados particulares. Como resultado, uma análise na literatura mostra a grande variedade de gêneros e espécies de fungos filamentosos que são atualmente foco de estudo. Essa diversidade faz com que muitas vezes as metodologias empregadas na análise molecular de processos biológicos tenham que ser adaptadas para o organismo específico com que se trabalha (MICHIELSE *et al.*, 2005; KHANG *et al.*, 2005).

Esta linha de raciocínio é bastante enfatizada quando tratamos das metodologias acima mencionadas na elucidação da função gênica. A superexpressão tem sido a metodologia mais empregada para este fim em fungos filamentosos (ST LEGER *et al.*, 1996; SCREEN *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2005). Interessante que, contrariamente ao grande número de genes candidatos a determinadas funções em processos relevantes, um número bastante limitado de

sistemas de expressão, e em especial de promotores, de fungos filamentosos tem sido descritos (DUTRA *et al.*, 2004; FREIMOSER *et al.*, 2003; FREIMOSER *et al.*, 2005; ST LEGER *et al.*, 1996; SCREEN *et al.*, 2001).

Em *Metarhizium*, embora vários genes já tenham sido testados, todos utilizaram sistemas heterólogos de expressão (ST LEGER *et al.* 1996; SCREEN *et al.*, 2001). O sistema mais empregado é baseado no promotor "constitutivo" *PgdpA* e seu associado o terminador *TtrpC*, ambos oriundos de *Aspergillus nidulans* (ST LEGER *et al.* 1996; SCREEN *et al.*, 2001; STAATS, 2004; FRANCHESCHINI; 2005). Embora nenhum estudo comparativo detalhado tenha sido realizado, a partir do conhecimento das muitas diferenças que existem entre os diferentes gêneros de fungos filamentosos, é possível prever que a expressão a partir de um promotor heterólogo não atinja a eficiência necessária para que sejam verificados os efeitos da expressão. Além disso, embora o promotor *PgpdA* seja, em geral, referido como de expressão constitutiva, alguns estudos tem mostrado que este não é o caso (BARBOSA *et al.*, 2004; WOLFF & ARNAU, 2002, WATERHAM *et al.*, 1997). Esta "regulação" pode ocorrer em determinado fungo ou em determinada condição e, portanto, interferir com o resultado desejado (PUYESKY *et al.*, 1997).

Este racional leva ao nosso objetivo de isolar e caracterizar promotores de *Metarhizium* que poderiam ser mais adequados para as análises de função gênica.

Para testar a funcionalidade do *PtefMa* aqui isolado utilizamos dois tipos de gene repórter: (i) o gene *bar*, que confere resistência a glifosinato de amônio e (ii) a proteína fluorescente sGFP. Utilizamos dois genes repórter para ampliar a margem de segurança de que o promotor seria funcional a ponto de poder conferir uma vantagem seletiva para os transformantes onde fosse introduzido e a

expressão de uma proteína facilmente detectável demonstrando a utilidade deste promotor para testar genes de *Metarhizium* em condições reais de infecção de hospedeiros.

A estrutura e o número de cópias do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae*, quando comparado aos ortólogos, apresenta muita variação. O número de cópias genômicas de *tef-1 α* apresenta grandes variações assim como o número e a organização dos introns.

A presença de cópia única foi descrita em *Ashbya gossypii* (STEINER & PHILIPPSEN, 1994), *Trichoderma reesei* (NAKARI et al., 1993), *Neurospora crassa* (ICHI-ISHI & INOUE, 1995), *Histoplasma capsulatum* (SHEARER, 1995), *Arxula adenivorans* (ROSEL & KUNZE, 1995), *Cryptococcus neoformans* (THORNEWELL et al., 1997), *Aureobasidium pullulans* (THORNEWELL et al., 1995) e *Podospora anserina* (SILAR & PICARD, 1994).

Duas ou mais cópias foram descritas em *Saccharomyces cerevisiae* (SCHIRMAIER & PHILIPPSEN, 1984), *Schizosaccharomyces pombe* (MITA et al., 1997), *Mucor racemosus* (SUNDSTROM et al., 1987), *Candida albicans* (SUNDSTROM et al., 1990), *Puccinia graminis* (SCHILLBERG et al., 1995) e *Absidia glauca* (BURMESTER, 1995), indicando possivelmente a presença de cópias extra em leveduras. Em seres humanos e ratos foram descritas de 15 a 20 cópias, entretanto a maioria é caracterizada como pseudogene, sendo somente duas cópias funcionais (UETSUKI et al., 1989; BISCHOFF et al., 2000).

Em *M. anisopliae* a presença de somente uma cópia do gene *tef-1 α* indica que a função gênica exercida é essencial, pois em organismos onde somente uma cópia está presente, a sua inativação resulta em fenótipos letais como descrito em *Podospora anserina* (SILAR et al., 2000). A possível presença de um sistema de inativação gênica para seqüências duplicadas como descrito em

Neurospora crassa (SELKER *et al.*, 1987), impediria a duplicação gênica em alguns organismos (GALAGAN & SELKER, 2004). Este mecanismo poderia regular a presença de duplicações em *M. anisopliae* no caso do gene *tef-1 α* . Em eucariotos superiores, onde ocorrem diversas cópias, estas podem ser importantes no desenvolvimento tecido específico (muscular e nervoso) como no caso do homem (CHAMBERS *et al.*, 1998). Em *Xenopus laevis* em cada fase do desenvolvimento uma das cópias genômicas é ativada (LORENI *et al.*, 1993).

O número e a localização dos íntrons do gene *tef-1 α* também é muito variável em fungos. Em *M. anisopliae* encontramos três íntrons no terço proximal da região codificadora, sendo esta organização muito similar àquela de *Neurospora crassa* (ICHI-ISHI, 1995). Em outros fungos observa-se desde a ausência de íntrons como em *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Ashybia gossypii* (NAGATA *et al.*, 1984; SCHIRMAIER & PHILIPPSEN, 1984; SUNDSTROM *et al.*, 1990) até a presença de um máximo de nove íntrons em *Puccinia graminis* (SCHILLBERG *et al.*, 1995).

A região promotora do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* não apresenta os elementos canônicos TATA e CAAT. Aparentemente isso não tem um significado muito importante, pois também no gene *trpC*, cuja função é essencial para a síntese do aminoácido triptofano, esses elementos não foram encontrados em *M. anisopliae* (STAATS *et al.*, 2004) nem em *Aspergillus nidulans* (MULLANEY *et al.*, 1985). Entretanto alguns genes regulados metabolicamente por fontes de carbono ou nitrogênio como os genes *pr1a* (protease) e *chit1* (quitinase), apresentam estas seqüências canônicas na região promotora (ST LEGER *et al.*, 1992; BOGO *et al.*, 1998). Isto indica que a região promotora do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* possa apresentar um sistema de elementos regulatórios diferente daqueles genes que apresentam regulação metabólica.

Em estudos comparativos da região promotora de grupos gênicos em diversos fungos, a conservação dos sítios de ligação a fatores de transcrição apresenta uma alta correlação somente quando os organismos são filogeneticamente próximos (GASCH *et al.*, 2004). Portanto, possivelmente não se observam regiões conservadas para fatores de transcrição como em *S. cerevisiae* e *N. crassa* (Ichi-Ishi *et al.*, 1996).

A seqüência deduzida de 460 resíduos de aminoácidos derivados do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* é muito conservada (identidade mínima de 88%) quando comparada com ortólogos de outros fungos. A alta conservação da seqüência de aminoácidos reflete principalmente a importância da proteína e que possivelmente ocorra uma pressão de seleção muito forte evitando a propagação de mutações neste gene (NEGRUSTSKII & EL'SKAYA, 1998).

O gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* tem a sua expressão detectável em diferentes meios contendo diferentes fontes de carbono e em diferentes fases de seu desenvolvimento. Em organismos que apresentam somente uma cópia genômica, autores demonstram uma regulação coordenada do gene *tef-1 α* com proteínas ribossômicas (ISCHI-ISHI & INOUE, 1995; KUSUDA *et al.*, 2000). Em organismos que apresentam mais de uma cópia, como em *Schizosaccharomyces pombe*, que possui 3 cópias genômicas, se encontram níveis de expressão diferentes em duas destas cópias quando submetidos a condições de estresse térmico e radiação UV (MITA *et al.*, 1997), permanecendo inalterada a expressão da cópia restante. No fungo *Mucor racemosus*, os níveis de mRNA das 3 cópias (*tef-1*, *tef-2* e *tef-3*) apresentam diferenças, sendo a transcrição de *tef-3* associada a morfogênese de levedura para hifa (LINZ & SYPHERD, 1988).

Em eucariotos superiores como o homem, camundongo e sapo, as cópias são expressas coordenadamente durante a embriogênese e tornam-se

específicas para cada tecido (BISCHOFF *et al.*, 2000; JOHNSON & KRIEG, 1995; CHAMBERS *et al.*, 1998). Em estados patológicos como neoplasias a superexpressão do gene *tef-1 α* é freqüentemente detectada, sendo as vezes considerado o principal responsável.

Recentemente em estudos de microarranjos (“microarrays”) o gene *tef-1 α* de *Metarhizium* apresentou variações no seu nível de expressão sendo reduzido em meio de cultura rico (SDB) e aumentado em meio contendo cutículas de 4 diferentes insetos (FREIMOSER *et al.*, 2005). Esta diferença, entretanto, pode estar associada à metodologia de transferência de micélio de 48 horas de cultivo para meio com cutículas de insetos. No nosso caso, a utilização de esporos geminando diretamente sobre a cutícula de *B.microplus* mimetizaria melhor a infecção natural e o nível de expressão do gene *tef-1 α* foi similar em ambas as condições. Além disso, o trabalho com microarranjos não apresentou nenhuma confirmação por “Northern” ou PCR em tempo real, e, portanto, deve ser analisado com cautela.

A utilização do gene *tef-1 α* em análises filogenéticas tem demonstrado a utilidade deste gene para a construção de árvores filogenéticas em conjunto com outros genes com alto grau de conservação, como os genes ribossomais e de β -tubulina em fungos (GENTILE *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2004). A análise filogenética de *M. anisopliae* baseado no gene *tef-1 α* indica uma maior relação da cepa E6 com *M. anisopliae* cepa ARESEF 3145 e *Cordyceps taii*.

O gênero *Cordyceps* tem sido associado com a forma sexuada do gênero *Metarhizium*, a partir de cultivos de *Cordyceps* e sequenciamento de DNA ribossomal (LIU *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2001). Apesar de *M. anisopliae* ARSEF 3145 e *C. taii* apresentarem uma correlação maior entre si, quando comparados com *M. anisopliae* cepa E6, esta diferença pode ser artificial devido ao erro

observado no sequenciamento do gene *tef-1 α* de *C. taii*, que apresenta 4 nucleotídeos de baixa qualidade nas posições 123, 144, 190 e 993 (GenBank AF543775).

A clonagem da região promotora do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* apresentou-se mais complexa do que o esperado para um gene com tanta conservação. Inicialmente, os clones obtidos a partir do primeiro banco genômico eram incompletos, não apresentando a região flanqueadora 5'. Posteriormente, utilizamos um banco enriquecido construído no plasmídeo pUC18, porém a análise de mais de três mil clones não permitiu o isolamento da região do DNA procurada. Duas alternativas foram empregadas paralelamente: (i) a construção de um novo banco genômico em vetor de bacteriófago e (ii) a utilização de uma estratégia de PCR inverso (iPCR). Ambas alternativas demonstraram-se eficientes e o gene completo e a sua respectiva região promotora foi finalmente isolada. Não temos nenhuma explicação experimental para a dificuldade encontrada.

Para testar a funcionalidade da região flanqueadora 5' do gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* utilizamos dois sistemas. Um baseado na expressão de uma marca de resistência, o gene *bar*, que expressa resistência ao glifosinato de amônio. O outro gene repórter utilizado foi a proteína sGFP. Esta proteína foi selecionada por apresentar uma expressão bastante consistente em fungos filamentosos (FERNANDEZ-ABALOS *et al.*, 1998; VAUTARD-MEY *et al.*, 1999; POGGELER *et al.*, 2003; FITZGERALD *et al.*, 2004; SHOJI *et al.*, 2005). A vantagem deste repórter é a possibilidade de poder ser detectado diretamente *in vivo*. Além disso, a proteína GFP pode ter a sua localização celular determinada e ainda a expressão, embora não tenhamos utilizado, pode ser quantificada (GORDON *et al.*, 2000). Outra vantagem da utilização do repórter GFP é que foi possível

demonstrar que a construção com o gene *tef-1 α* de *Metarhizium*, aparentemente, não alterou a capacidade do fungo infectar seu hospedeiro. Isso é relevante uma vez que a utilização dos vetores de expressão, neste caso, tem como objetivo principal determinar a função de genes isolados no processo de infecção.

Diversos autores têm demonstrado a utilização da região do promotor do gene *tef-1 α* para a construção de vetores de expressão em cultivos celulares (MIZUSHIMA & NAGATA, 1990), em camundongos (CHEVALIER-MARIETTE *et al.*, 2003) e em fungos dos gêneros *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Absidia* (GARCÍA-RAMÍREZ *et al.*, 1995; KITAMOTO *et al.*, 1998; MULLER *et al.*, 1998; SCHILDE *et al.*, 2001). Vacinas de DNA também têm utilizado o promotor do gene *tef-1 α* com êxito para imunizar camundongos contra diversos antígenos de patógenos humanos (KAMEI *et al.*, 2000); ou para a síntese de enzimas em casos de anomalias genéticas (HONG *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2001).

Os vetores de expressão baseados no promotor do gene *tef-1 α* que construímos e testamos se mostraram eficientes, tanto no sistema de transformação quanto na expressão da proteína repórter sGFP em *Metarhizium anisopliae*.

Apesar dos plasmídeos PTEFGFP e PTEFBAR apresentarem regiões homólogas, devido ao promotor, os eventos de integração após a transformação provavelmente não foram por recombinação homóloga como mostramos pela análise de hibridização (Figura 14). Os sítios de integração foram ectópicos. Em outros experimentos de transformação em *M. anisopliae*, este tipo de integração heteróloga também foi observado tanto em transformações simples ou co-transformações, apesar da ausência de seqüências homólogas nos vetores de expressão utilizados (BERNIER *et al.*, 1989; GOETTEL *et al.*, 1990; ST LEGER *et al.*, 1995; INGLIS *et al.*, 2000). BOGO *et al.* (1996) obtiveram uma alta taxa de

recombinação homóloga, mesmo com os vetores não apresentando seqüências homólogas, porém o sistema de transformação utilizado foi a biobalística.

Demonstramos a funcionalidade da região de 640 kb que flanqueia a 5' o gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* pela detecção de fluorescência emitida pela proteína sGFP nos transformantes contendo integrada a construção pTEFGFP. A fluorescência foi observada tanto em cultivos do fungo em meio de cultura, quanto em bioensaios em carrapatos (Figuras 15 e 17). Portanto, este promotor pode ser utilizado para a expressão de proteínas em *Metarhizium* demonstrando que é possível: (i) detectar a expressão da fluorescência permitindo que genes de *Metarhizium* sejam testados e (ii) que expressa níveis suficientes de BAR para conferir resistência.

Além disso, nos transformantes não é observada nenhuma alteração no crescimento ou na produção de esporos, problema recorrente detectado em transformantes resistentes ao benomil (BERNIER *et al.*, 1989). Também ocorre expressão em níveis suficientes para detectar em bioensaios, o que é fundamental para testar genes isolados e construir transformantes mais eficientes (ST LEGER *et al.*, 1996).

Diversos autores têm relatado a diminuição da patogenicidade em transformantes de *Metarhizium anisopliae* (INGLIS *et al.*, 2000; BERNIER *et al.*, 1989). Nossas construções usando o promotor *Ptef*, no entanto, não apresentaram alterações da patogenicidade como demonstramos em bioensaios com *B. microplus* quando comparado com a cepa selvagem. Esta é uma característica desejável, pois os transformantes podem ser monitorados ambientalmente, através de genes repórteres como a sGFP, e facilitaria os estudos de fenômenos fisiológicos e de interação hospedeiro/patogeno, como

descritos em outros sistemas (WYMELENBERG *et al.*, 1997, WEBB *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003).

6 Conclusões

O gene *tef-1 α* de *M. anisopliae* é de cópia única e tem uma CDS de 1.825 pb e apresenta uma ORF de 460 aa que está interrompida por 3 introns.

A região regulatória, a montante do códon de iniciação, não apresenta regiões consenso TATA e CAAT Box.

Filogeneticamente, baseado na seqüência de aminoácidos do gene *tef-1 α* , *M. anisopliae* cepa E6 está associado ao fungo *Cordyceps taii*.

A expressão do gene *tef-1 α* , em termos de transcritos, foi observada em cultivos do fungo em diferentes fontes de carbono e fases de desenvolvimento, tendo, provavelmente, expressão constitutiva.

Um fragmento de DNA de 639 pb da região flangeadora 5' (*Ptef-1 α*) foi capaz controlar a expressão dos genes repórter sGFP e BAR, expressando os fenótipos de fluorescência e resistência ao glifosinato de amônio.

Transformantes contendo vetores de expressão baseados em *Ptef-1 α* foram integrados ao genoma do fungo e não apresentaram alterações detectáveis na patogenicidade contra o carrapato *B. microplus*. As quantidades expressadas do repórter sGFP permitiram detectar fluorescência durante o processo de infecção.

Vetores baseados em *Ptef-1 α* serão ferramentas importantes na determinação da função de genes isolados em *M. anisopliae* o que deverá contribuir para o melhor entendimento do processo de infecção.

7 Perspectivas

Utilização de plasmídeos contendo PtefMa para superexpressão de genes associados a virulência.

Construção de cassetes para expressão baseados em PtefMa para inativação gênica utilizando-se o sistema de transformação com *Agrobacterium tumefaciens*.

8 Referência bibliográfica

- AGRAWAL, N.; DASARADHI, P.V.; MOHMMED, A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R.K.; MUKHERJEE, S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 67, n. 4, p. 657-685. 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410. 1990.
- ALVES, S.B. Controle microbiano de inseto. Ed. 2. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. 1998.
- ARONSON, B.D., LINDGREN, K.M., DUNLAP, J.C., LOROS, J.J. An efficient method for gene disruption in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 242, n. 4, p. 490-494. 1994.
- BALDAUF, S.L.; PALMER, J.D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, v. 90, n. 24, p.11558-11562. 1993.
- BARBOSA, M.S.; CUNHA PASSOS, D.A.; FELIPE, M.S.; JESUINO, R.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.*, v. 41, n. 7, p. 667-675. 2004.
- BENJAMIN, M.A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R.S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* v.39, n. 5, p.723-728. 2002.
- BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, v. 66, n. 2-3, p. 101-107. 1998.
- BERKA, R.M.; BARNETT, C.C. The development of gene expression systems for filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.*, v. 7, n. 2, p. 127-154. 1989.
- BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. Transformation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 60, p. 261-266. 1989.
- BEYS SILVA, W.O.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v.40, n. 1, p. 321-326. 2005.
- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A.M.; LAVENDER, T.M.; DEKONING, J.; DE CROOS, J.N. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n. 3, p.1335-1342. 2001.

- BIDOCHKA, M.J.; ST LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Induction of Novel Proteins in *Manduca sexta* and *Blaberus giganteus* as a Response to Fungal Challenge. *J. Invertebr. Pathol.*, v.70, n. 3, p.184-189. 1997.
- BISCHOFF, C.; KAHNS, S.; LUND, A.; JORGENSEN, H.F.; PRAESTEGAARD, M.; CLARK, B.F.; LEFFERS, H. The human elongation factor 1 A-2 gene (EEF1A2): complete sequence and characterization of gene structure and promoter activity. *Genomics*, v.68, n. 1, p.63-70. 2000.
- BLANFORD, S.; CHAN, B.H.K.; JENKINS, N.; SIM, D.; TURNER, R.J.; READ, A.F.; THOMAS, M.B. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1638-1641. 2005.
- BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO JR, H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr.Microbiol.*, v.37, n. 4, p.221-225. 1998.
- BOGO, M.R.; VAINSTEIN, M.H.; ARAGAO, F.J.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.142, n. 1, p.123-127. 1996.
- BREFORT, T.; MULLER, P.; KAHMANN, R. The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of *prf1* in *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell*, v.4, n. 2, p. 379-391. 2005.
- BROOKS, A.J.; WALL, R. Infection of *Psoroptes* mites with the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 25, n. 10-11, p. 869-880. 2001.
- BURMESTER, A. Analysis of the gene for the elongation factor 1 alpha from the zygomycete *Absidia glauca*. Use of the promoter region for constructions of transformation vector. *Microbiol. Res.* v.150, n. 1, p. 63-70. 1995.
- BURMESTER, A.; WOSTEMEYER, A.; ARNAU, J.; WOSTEMEYER, J. The SEG1 element: a new DNA region promoting stable mitotic segregation of plasmids in the zygomycete *Absidia glauca*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 235, n. 2-3, p. 166-172. 1992.
- CHAMBERS, D.M.; PETERS, J.; ABBOTT, C.M. The lethal mutation of the mouse wasted (*wst*) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1alpha, encoded by the *Eef1a2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.95, n. 8, p. 4463-4468. 1998.
- CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P.H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. *J. Microbiol. Methods*, v.53, n. 1, p. 113-122. 2003.
- CHEN, Q.; DING, Q.; THORPE, J.; DOHMEN, R.J.; KELLER, J.N. RNA interference toward UMP1 induces proteasome inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for protein oxidation and autophagic cell death. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 38, n. 2, p. 226-234. 2005.

- CHEVALIER-MARIETTE, C.; HENRY, I.; MONTFORT, L.; CAPGRAS, S.; FORLANI, S.; MUSCHLER, J.; NICOLAS, J.F. CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol.*, v. 4, n. 9, p.53-53. 2003.
- CHICAS, A.; COGONI, C.; MACINO, G. RNAi-dependent and RNAi-independent mechanisms contribute to the silencing of RIPed sequences in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.*, v. 32, n. 14, p. 4237-4243. 2004.
- CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, v.4, p.197-204. 1996.
- COGONI, C.; IRELAN, J.T.; SCHUMACHER, M.; SCHMIDHAUSER, T.J.; SELKER, E.U.; MACINO, G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.*, v. 15, n. 12, p. 3153-3163. 1996.
- COVE, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.113, n. 1, p. 51-56. 1966.
- CURRIE, C.R.; WONG, B.; STUART, A.E.; SCHULTZ, T.R.; REHNER, S.A.; MUELLER, U.G.; SUNG, G.H.; SPATAFORA, J.W.; STRAUS, N.A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, v. 299, n. 5605, p. 386-388. 2003.
- DA COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; DE MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, v. 154, n. 4, p. 207-209. 2002.
- DA SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C.C.; DA COSTA, A.M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res. Microbiol.*, v.156, n. 3, p. 382-392. 2005.
- DE BACKER, M.D.; RAPONI, M.; ARNDT, G.M. RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 5, n. 3, p. 323-329. 2002.
- DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, v.104, p.134-150. 2000.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SILVEIRA, S.I.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res. Microbiol.*, v.155, n. 4, p. 245-251. 2004.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. *Accuracy & Assessment. Genome Research*, v.8, n. 3, p.175-185. 1998.

- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n. 1, p. 363-370. 2005.
- FERNANDEZ-ABALOS, J.M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J.H. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, v. 27, n. 1, p. 121-130. 1998.
- FINCHAM, J.R. Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.*, v. 53, n. 1, p. 148-170. 1989.
- FITZGERALD, A., VAN KAN, J.A., PLUMMER, K.M. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet. Biol.*, v. 41, n. 10, p. 963-971. 2004.
- FRANCESCHINI, M. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese de dissertação de doutorado. UFRGS. p. 1-150. 2005.
- FRAZZON, A.P.; DA SILVA, V.J., I; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v.94, n. 1-2, p. 117-125. 2000.
- FREIMOSER, F.M.; HU, G.; ST LEGER, R.J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, v.151, n. 2, p. 361-371. 2005.
- FREIMOSER, F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R.J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, v.149, n. 1, p. 239-247. 2003.
- GALAGAN, J.E.; SELKER, E.U. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends Genet.*, v. 20, n. 9, p. 417-423. 2004.
- GARCÍA-RAMREZ, J.J.; SANTOS, M.A.; REVUELTA, J.L. The *Saccharomyces cerevisiae* RIB4 Gene Codes for 6,7-Dimethyl- 8-ribityllumazine Synthase Involved in Riboflavin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 40, p. 23801-23807. 1995.
- GASCH, A.P.; MOSES, A.M.; CHIANG, D.Y.; FRASER, H.B.; BERARDINI, M.; EISEN, M.B. Conservation and evolution of cis-regulatory systems in ascomycete fungi. *PLoS. Biol.*, v. 2, n. 12, p. 398-398. 2004.
- GENTILE, A.; ROSSI, M.S.; CABRAL, D.; CRAVEN, K.D.; SCHARDL, C.L. Origin, divergence, and phylogeny of epichloe endophytes of native Argentine grasses. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 35, n. 1, p. 196-208. 2005.
- GILL, D.R.; SMYTH, S.E.; GODDARD, C.A.; PRINGLE, I.A.; HIGGINS, C.F.; COLLEDGE, W.H.; HYDE, S.C. Increased persistence of lung gene

expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther.*, v. 8, n. 20, p. 1539-1546. 2001.

- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: *Manual of techniques in insect pathology*. LACEY, L.A. Academic Press. New York. p. 213-249. 1997.
- GOETTEL, M.S.; ST LEGER, R.J.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stable transformed to benomyl resistance. *Curr. Genet.*, v. 17, p. 129-132. 1990.
- GOLDONI, M.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, v. 41, n. 11, p. 1016-1024. 2004.
- GOPALKRISHNAN, R.V.; SU, Z.Z.; GOLDSTEIN, N.I.; FISHER, P.B. Translational infidelity and human cancer: role of the PTI-1 oncogene. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 31, n. 1, p. 151-162. 1999.
- GORDON, C.L.; KHALAJ, V.; RAM, A.F.J.; ARCHER, D.B.; BROOKMAN, J.L.; TRINCI, A.P.J.; JEENES, D.J.; DOONAN, J.H.; WELLS, B.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.; ROBSON, G.D. Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology*. v.146, n. 2, p. 415-426. 2000.
- HABIB, A.N.; HAVLIK, R.; JIAO, L.; KIRI, A.; JENSEN, S.; NICHOLLS, J.; SARRAF, C.; GOLDSPINK, G.; DAVIES, A.; SLAVIK, L.; WOOD, C. Combination of Optison® with ultrasound and electroporation increases albumin and thrompoietin transgene expression whilst elongation factor promoter prolongs its duration. *Gene Ther. Mol. Biol.*, v. 8, n. A, p. 1-8. 2004.
- HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P.; VANDENBERG, J.D. Control of arthropods using pathogenic fungi. In: "Bio-Exploitation of Filamentous Fungi". POINTING, S.P. , HYDE, K.D. Fungal diversity press. Hong Kong. p. 309-347. 2001.
- HARRISON, R.L.; BONNING, B.C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: *Biological and biotechnological Control of insects pests*. RECHCIGL, J.E. , RECHCIGL, N.A. Lewis Publishers. Boca Raton. p. 243-280.1998.
- HINNEN, A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, n. 4, p. 1929-1933. 1978.
- HONDEL, C.A.M.J.J.; PUNT, P.J. Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. In: *Applied Molecular Genetics of Fungi*. PEBERDY, J.F. Cambridge University Press. p. 1-28,1991.
- HONG, Y.B.; KIM, E.Y.; YOO, H.W.; JUNG, S.C. Feasibility of gene therapy in Gaucher disease using an adeno-associated virus vector. *J. Hum. Genet.*, v. 49, n. 10, p. 536-543. 2004.
- HOVEMANN, B.; RICHTER, S.; WALLDORF, U.; CZIEPLUCH, C. Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in

- Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Res.*, v. 16, n. 8, p. 3175-3194. 1988.
- HU, G.; ST LEGER, R. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, n. 12, p. 6383-6387. 2002.
- ICHI-ISHI, A.; INOUE, H. Cloning, nucleotide sequence, and expression of *tef-1*, the gene encoding translation elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) of *Neurospora crassa*. *Jpn. J. Genet.* v. 70, n. 2, p. 273-287. 1995.
- INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. *Fungi as Biocontrol Agents*, Wallingford: CAB International, p. 23-69. 2001
- INGLIS, P.W.; ARAGAO, F.J.; FRAZAO, H.; MAGALHAES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M.C. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 191, n. 2, p. 249-254. 2000.
- INOUE, I.; NAMIKI, F.; TSUGE, T. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. *Plant Cell*, v. 14, n. 8, p. 1869-1883. 2002.
- JAKOBSSON, J.; ERICSON, C.; JANSSON, M.; BJORK, E.; LUNDBERG, C. Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J. Neurosci. Res.*, v. 73, n 6, 876-885. 2003.
- JOHNSON, A.D.; KRIEG, P.A. A *Xenopus laevis* gene encoding EF-1 alpha S, the somatic form of elongation factor 1 alpha: sequence, structure, and identification of regulatory elements required for embryonic transcription. *Dev.Genet.*, v. 17, n. 3, p. 280-290. 1995.
- JUAREZ, M.P.; CRESPO, R.; FERNANDEZ, G.C.; LECUONA, R.; CAFFERATA, L.F. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 76, n. 3, p. 198-207. 2000.
- KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 67, n. 1, p.15-20. 1996.
- KADOTANI, N.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 16, n. 9, p. 769-776. 2003.
- KAMEI, A.; TAMAKI, S.; TANIYAMA, H.; TAKAMURA, S.; NISHIMURA, Y.; KAGAWA, Y.; UNO-FURUTA, S.; KAITO, M.; KIM, G.; TODA, M.; MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T.; ADACHI, Y.; YASUTOMI, Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology*, v.273, n. 1, p. 120-126. 2000.

- KANGA, L.H.; JAMES, R.R.; BOUCIAS, D.G. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 81, n. 3, p. 175-184. 2002.
- KANGA, L.H.; JONES, W.A.; JAMES, R.R. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.*, v. 96, n. 4, p. 1091-1099. 2003.
- KEELING, P.J.; INAGAKI, Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 α . *Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 101, n. 43, p. 15380-15385. 2004.
- KERSHAW, M.J.; MOORHOUSE, E.R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 74, n. 3, p. 213-223. 1999.
- KHANG, C.H.; PARK, S.Y.; LEE, Y.H.; KANG, S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.*, v. 42, n. 6, p. 483-492. 2005.
- KIM, D.W.; HARADA, T.; SAITO, I.; MIYAMURA, T. An efficient expression vector for stable expression in human liver cells. *Gene*, v.134, n. 2, p. 307-308. 1993.
- KIM, D.W.; UETSUKI, T.; KAZIRO, Y.; YAMAGUCHI, N.; SUGANO, S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, v. 91, n. 2, p. 217-223. 1990.
- KITAMOTO, N., YOSHINO, S., OHMIYA, K., TSUKAGOSHI, N. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 63, n. 10, p. 1791-1794. 1999.
- KITAMOTO, N.; MATSUI, J.; KAWAI, Y.; KATO, A.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Utilization of the TEF1-alpha gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 50, n. 1, p. 85-92. 1998.
- KITAMOTO, N.; OKADA, H.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Pectin methylesterase gene (*pmeA*) from *Aspergillus oryzae* KBN616: its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 63, n. 1, p. 120-124. 1999.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software4. *Bioinformatics*, v. 17, n. 12, p. 1244-1245. 2001.
- KUSUDA, M.; YAJIMA, H.; INOUE, H. Characterization and expression of a *Neurospora crassa* ribosomal protein gene, *crp-7*. *Curr. Genet.*, v. 37, n. 2, p. 119-124. 2000.

- LEE, S.; FRANCOEUR, A.M.; LIU, S.; WANG, E. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 33, p. 24064-24068. 1992.
- LIANG, Z.Q.; LIU, A.Y.; LIU, J.L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica*, v. 10, p. 257-262. 1991.
- LINZ, J.E.; KATAYAMA, C.; SYPHERD, P.S. Three genes for the elongation factor EF-1 alpha in *Mucor racemosus*. *Mol. Cell Biol.*, v. 6, n. 2, p. 593-600. 1986.
- LINZ, J.E.; SYPHERD, P.S. Expression of three genes for elongation factor 1 alpha during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Mol. Cell Biol.*, v. 7, n. 5, p. 1925-1932. 1987.
- LIU, H.; SKINNER, M.; PARKER, B.L.; BROWNBRIDGE, M. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.*, v. 95, n. 4, p. 675-681. 2002.
- LIU, Y.P.; DOVZHENKO, O.V.; GARTHWAITE, M.A.; DAMBAEVA, S.V., DURNING, M., POLLASTRINI, L.M., GOLOS TG. Maintenance of Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells Stably Over-expressing Enhanced Green Fluorescent Protein. *Stem Cells Dev.*, v. 13, n. 6, p. 636-645. 2004
- LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Invert. Pathol.*, v. 78, p. 178-182. 2001.
- LORENI, F.; FRANCESCONI, A.; AMALDI, F. Coordinate translational regulation in the syntheses of elongation factor 1 alpha and ribosomal proteins in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, n. 20, p. 4721-4725. 1993.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, n. 4, p. 249-270. 2005.
- MACH, R.L.; SCHINDLER, M.; KUBICEK, C.P. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr. Gen.*, v.25, n. 6, p. 567-570. 1994.
- MACKENZIE, D.A.; WONGWATHANARAT, P.; CARTER, A.T.; ARCHER, D.B. Isolation and Use of a Homologous Histone H4 Promoter and a Ribosomal DNA Region in a Transformation Vector for the Oil-Producing Fungus *Mortierella alpina*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 11, p. 4655-4661. 2000.
- MADSEN, H.O.; POULSEN, K.; DAHL, O.; CLARK, B.F.; HJORTH, J.P. Retropseudogenes constitute the major part of the human elongation factor 1 alpha gene family. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, n. 6, p. 1513-1516. 1990.
- MALCHER, R. Clonagem e caracterização parcial do cDNA do gene *tef-1* alfa de *Trichoderma harzianum*. Tese de Mestrado. UnB. 1997.

- MICHIELSE, C.B.; HOOYKAAS, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.; RAM, A.F. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.*, v. 48, n. 1, p. 1-17. 2005.
- MILNER, R.J. Current status of *Metarhizium anisopliae* in Australia. *Biocontrol*, v. 21, p. 47-50. 2000.
- MITA, K.; MORIMYO, M.; ITO, K.; SUGAYA, K.; EBIHARA, K.; HONGO, E.; HIGASHI, T.; HIRAYAMA, Y.; NAKAMURA, Y. Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors. *Gene*, v. 187, n. 2, p. 259-266. 1997.
- MIZUSHIMA, S.; NAGATA, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, n. 17, p. 5322. 1990.
- MONSCHAU, N.; SAHM, H.; STAHMANN, K. Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 11, p. 4283-4290. 1998.
- Moon, C.D.; Craven, K.D.; Leuchtman, A.; Clement, S.L., Schardl, C.L. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes grasses. *Mol. Ecol.*, v.13, n.6, p. 1455-1467. 2004.
- MORALEJO, F.J.; CARDOZA, R.E.; GUTIERREZ, S.; LOMBRANA, M.; FIERRO, F.; MARTIN, J.F. Silencing of the aspergillopepsin B (pepB) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, n. 7, p. 3550-3559. 2002.
- MORENO, C.M.; BECERRA, A.G.; SANTOS, M.J.B. Biological treatments for contaminated soils: hydrocarbon contamination. Fungal applications in bioremediation treatment. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 21, n. 3, p. 103-120. 2004.
- MULLANEY, E.J.; HAMER, J.E.; ROBERTI, K.A.; YELTON, M.M.; TIMBERLAKE, W.E. Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 199, n. 1, p. 37-45. 1985.
- MULLER, S.; SANDAL, T.; KAMP-HANSEN, P.; DALBOGE, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, v. 14, n. 14, p. 1267-1283. 1998.
- MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol. Life Sci.*, v. 58, n. 14, p. 2043-2052. 2001.
- MUMBERG, D.; MULLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, v. 156, n. 1, p. 119-122. 1995.
- NAGATA, S.; NAGASHIMA, K.; TSUNETSUGU-YOKOTA, Y.; FUJIMURA, K.; MIYAZAKI, M.; KAZIRO, Y. Polypeptide chain elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) from yeast: nucleotide sequence of one of the two genes for EF-1 alpha from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, v. 3, n. 8, p. 1825-1830. 1984.

- NAKARI, T.; ALATALO, E.; PENTTILA, M.E. Isolation of *Trichoderma reesei* genes highly expressed on glucose-containing media: characterization of the *tef1* gene encoding translation elongation factor 1 alpha 30. *Gene*, v. 36, n. 1-2, p. 313-318. 1993.
- NAKARI-SETALA, T.,PENTTILA, M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 10, p. 3650-3655. 1995.
- NEGRUTSKII, B.S.; EL'SKAYA, A.V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v. 60, p. 47-78. 1998.
- NISHIMURA, Y.; KAMEI, A.; UNO-FURUTA, S.; TAMAKI, S.; KIM, G.; ADACHI, Y.; KURIBAYASHI, K.; MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T.; YASUTOMI, Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-alpha promoter elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). *Vaccine*, v. 18, n. 7-8, p. 675-680. 1999.
- NOZAKI, H.; MATSUZAKI, M.; TAKAHARA, M.; MISUMI, O.; KUROIWA, H.; HASEGAWA, M.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; OGASAWARA, N.; KUROIWA, T. The phylogenetic position of red algae revealed by multiple nuclear genes from mitochondria-containing eukaryotes and an alternative hypothesis on the origin of plastids. *J. Mol. Evol.*, v.56, n.4, p. 485-497. 2003.
- OCHMAN, H. Inverse PCR. In: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.
- OH, J.H.; SOHN, H.Y.; KIM, J.M.; KIM, Y.S.; KIM, N.S. Construction of multi-purpose vectors, pCNS and pCNS-D2, are suitable for collection and functional study of large-scale cDNAs. *Plasmid*, v. 51, n. 3, p. 217-226. 2004.
- OLIVEIRA, R.C.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, L.F.A. Entomopathogenic fungi selection to control *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in Paraguay tea crops (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). *Neotrop. Entomol.*, v. 33, n. 3, p. 347-351. 2004.
- OLSON, P.D.; CAIRA, J.N. Evolution of the major lineages of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoidea) inferred from 18S ribosomal DNA and elongation factor-1 alpha. *J. Parasitol.*, v. 85, n. 6, p. 1134-1159. 1999.
- ONOFRE, S.B.; MINIUK, C.M.; DE BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, n. 9, p. 1478-1480. 2001.
- ORBACH, M.J.; PORRO, E.B.; YANOFSKY, C. Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol. Cell Biol.*, v. 6, n. 7, p. 2452-2461. 1986.

- POGGELER, S., MASLOFF, S., HOFF, B., MAYRHOFER, S., KUCK, U. Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Curr. Genet.*, v. 43, n. 1, p. 54-61. 2003.
- PUNT, P.J.; VAN, B.N.; CONESA, A.; ALBERS, A.; MANGNUS, J.; VAN DEN, H.C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production 23. *Trends Biotechnol.*, v. 20, n. 5, p. 200-206. 2002.
- PUNT, P.J.; DINGEMANSE, M.A.; KUYVENHOVEN, A.; SOEDE, R.D.; POWWELS, P.H.; VAN DEN HONDEL, C.A. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, v. 93, n. 1, p. 101-109. 1990.
- PUYESKY, M.; PONCE-NOYOLA, P.; HORWITZ, B.A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in *Trichoderma harzianum* is repressed during conidiation and mycoparasitism. *Microbiology*, v. 143, p. 3157-3164. 1997.
- QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIROS, R.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 87, n. 1, p. 51-58. 2004.
- ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 54, p. 1-70. 2004.
- ROGER, A.J.; SANDBLOM, O.; DOOLITTLE, W.F.; PHILIPPE, H. An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, v. 16, n. 2, p. 218-233. 1999.
- ROSEL, H.; KUNZE, G. Cloning and characterization of a TEF gene for elongation factor 1 alpha from the yeast *Arxula adenivorans*. *Curr. Genet.*, v. 28, n. 4, p. 360-366. 1995.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.
- SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 44, p. 159-182. 1999.
- SCHILDE, C.; WOSTEMEYER, J.; BURMESTER, A. Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Arch. Microbiol.*, v. 175, n. 1, p. 1-7. 2001.
- SCHILLBERG, S.; GROSS, P.; TIBURZY, R. Isolation and characterization of the EF-1 alpha gene of the filamentous fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Curr. Genet.*, v. 27, n. 4, p. 367-372. 1995.
- SCHIRMAIER, F.; PHILIPPSSEN, P. Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*. *EMBO J.*, v. 3, n. 13, p. 3311-3315. 1984.

- SCHMIDT, H.; ADLER, A.; HOLST-JENSEN, A.; KLEMSDAL, S.S.; LOGRIECO, A.; MACH, R.L.; NIRENBERG, H.I.; THRANE, U.; TORP, M.; VOGEL, R.F.; YLI-MATTILA, T.; NIESSEN, L. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 95, n. 3, p. 341-349. 2004.
- SCHOLTE, E.J.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K., ABDULLA, S.; KILLEEN, G.F.; KNOLS, B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1531-1533. 2005.
- SCHOLTE, E.J.; NJIRU, B.N.; SMALLEGANGE, R.C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B.G. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar. J.*, v. 2, n. 1, p. 29-29. 2003.
- SCREEN, S.E.; HU, G.; ST LEGER, R. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 78, n. 4, p. 260-266. 2001.
- SELKER, E.U.; CAMBARERI, E.B.; JENSEN, B.C.; HAACK, K.R. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. *Cell*, v. 51, n. 5, p. 741-752. 1987.
- SHEARER JR, G. Cloning and analysis of cDNA encoding an elongation factor 1 alpha from the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Gene*, v. 161, n. 1, p. 119-123. 1995.
- SHIRASAWA, T.; SAKAMOTO, K.; AKASHI, T.; TAKAHASHI, H.; KAWASHIMA, A. Nucleotide sequence of rat elongation factor-1 alpha cDNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, n. 4, p. 909-1992.
- SHOJI, J.Y.; MARUYAMA, J.; ARIOKA, M.; KITAMOTO, K. Development of *Aspergillus oryzae* *thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 244, n. 1, p. 41-46. 2005.
- SILAR, P.; PICARD, M. Increased longevity of EF-1 alpha high-fidelity mutants in *Podospora anserina*. *J. Mol. Biol.*, v. 235, n. 1, p. 231-236. 1994.
- SILAR, P.; ROSSIGNOL, M.; TAHAR, R.; DERHY, Z.; MAZABRAUD, A. Informational suppressor alleles of the eEF1A gene, fertility and cell degeneration in *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 264, n. 3, p. 354-362. 2000.
- SMITH, K.E.; WALL, R.; FRENCH, N.P. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Vet. Parasitol.*, v. 92, n. 2, p. 97-105. 2000.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V.E.A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Newsletters*, v. 37, p. 41-43. 1990.

- SOMMER, U.; LIU, H.; DOERING, T.L. An alpha-1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 48, p. 47724-47730. 2003.
- SONG, S.; EMBURY, J.; LAIPIS, P.J.; BERNS, K.I.; CRAWFORD, J.M.; FLOTTE, T.R. Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther.*, v. 8, n. 17, p. 1299-1306. 2001.
- ST LEGER, R.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, n. 13, p. 6349-6354. 1996.
- ST LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.*, v. 132, p.1509-1517. 1986.
- ST LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.*, v. 204, n. 3, p. 991-1001. 1992.
- ST LEGER, R.J.; GOETTEL, M.S.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, v. 58, p. 168-179. 1991.
- ST LEGER, R.J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. *FEMS Microbiology Letters*, v. 131, n. 3, p. 289-294. 1995.
- STAATS, C.C.; SILVA, M.S.; PINTO, P.M.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. The *Metarhizium anisopliae* *trp1* gene: cloning and regulatory analysis. *Curr. Microbiol.*, v. 49, n. 1, p. 66-70. 2004.
- STEINER, S.; PHILIPPSEN, P. Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* 16. *Mol. Gen. Genet.*, v. 242, n. 3, p. 263-271. 1994.
- STEINHAUS, E.A. *Disease in Minor Chord*. Ohio State University Press. Columbus, Ohio. 1975.
- SUNDSTROM, P.; IRWIN, M.; SMITH, D.; SYPHERD, P.S. Both genes for EF-1 alpha in *Candida albicans* are translated. *Mol. Microbiol.*, v. 5, n. 7, p. 1703-1706. 1991.
- SUNDSTROM, P.; LIRA, L.M.; CHOI, D.; LINZ, J.E.; SYPHERD, P.S. Sequence analysis of the EF-1 alpha gene family of *Mucor racemosus*. *Nucleic Acids Res.*, v. 15, n. 23, p. 9997-10006. 1987.
- SUNDSTROM, P.; SMITH, D.; SYPHERD, P.S. Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, v. 172, n. 4, p. 2036-2045. 1990.
- TERENTIEV, Y.; PICO, A.H.; BOER, E.; WARTMANN, T.; KLABUNDE, J.; BREUER, U.; BABEL, W.; SUCKOW, M.; GELLISSEN, G.; KUNZE, G. A

wide-range integrative yeast expression vector system based on *Arxula adenivorans*-derived elements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 31, n. 5, p. 223-228. 2004.

- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 24, p. 4876-4882. 1997.
- THORNEWELL, S.J.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P.L. Cloning and characterization of the gene encoding translation elongation factor 1 alpha from *Aureobasidium pullulans*. *Gene*, v. 162, n. 1, p. 105-110. 1995.
- THORNEWELL, S.J.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P.L. Cloning and molecular characterization of CnTEF1 which encodes translation elongation factor 1alpha in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol.*, v. 22, n. 2, p. 84-91. 1997.
- THORNEWELL, S.J.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P.L. Integrative and replicative genetic transformation of *Aureobasidium pullulans*. *Curr. Genet.*, v. 29, n. 1, p. 66-72. 1995.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v. 66, p. 407-411. 1976.
- UETSUKI, T.; NAITO, A.; NAGATA, S.; KAZIRO, Y. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 10, p. 5791-5798. 1989.
- VALADARES-INGLIS, M.C.; PEBERDY, J.F. Variation in the electrophoretic karyotype of Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae*. *Genet. Mol. Biol.*, v. 21, n. 1, 1998.
- VANDEN WYMELENBERG, A.J.; CULLEN, D.; SPEAR, R.N.; SCHOENIKE, B.; ANDREWS, J.H. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *Biotechniques*, v. 23, n. 4, p. 686-690. 1997.
- VAUTARD-MEY, G.; COTTON, P.; FEVRE, M. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Biochem.*, v. 266, n. 1, p. 252-259. 1999.
- WALLICH, R.; SIEBERS, A.; JAHRAUS, O.; BRENNER, C.; STEHLE, T.; SIMON, M.M. DNA vaccines expressing a fusion product of outer surface proteins A and C from *Borrelia burgdorferi* induce protective antibodies suitable for prophylaxis but Not for resolution of Lyme disease. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 4, p. 2130-2136. 2001.
- WATERHAM, H.R.; DIGAN, M.E.; KOUTZ, P.J.; LAIR, S.V.; CREGG, J.M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, v. 186, n. 1, p. 37-44. 1997.
- WEBB, J.S.; BARRATT, S.R.; SABEV, H.; NIXON, M.; EASTWOOD, I.M.; GREENHALGH, M.; HANDLEY, P.S.; ROBSON, G.D. Green fluorescent

protein as a novel indicator of antimicrobial susceptibility in *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 12, p. 5614-5620. 2001.

- WOLFF, A.M.; ARNAU, J. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genet. Biol.*, v. 35, n. 1, p. 21-29. 2002.
- YI, L.Z.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 78, n. 3, p. 178-182. 2001.
- ZENG, X.; CHEN, J.; SANCHEZ, J.F.; COGGIANO, M.; LLON-CARTER, O.; PETERSEN, J.; FREED, W.J. Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*, v. 21, n. 6, p.647-653. 2003.
- ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L.A.; CERNIGLIA, C.E. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 145, n. 2, p. 261-265. 1996.

9 Apêndice 1

Meio completo (MC)

Em 1 litro:

NaNO ₃	6g
Glicose	10g
Solução de sais	20mL
Elementos traços	0,4mL
H ₂ O destilada	q.s.p. 1.000mL

Meio Completo de Cove (MCc)

Em 1 litro:

NaNO ₃	6g
Glicose	10g
Extrato de levedura	0,5g
Peptona	2g
Casaminoácidos	1,5g
Solução de sais	20mL
Elementos traços	0,4mL
H ₂ O destilada	q.s.p. 1.000mL

Meio Sabouraud:

Em 1 litro:

Peptona	10g
Glicose	40g
H ₂ O destilada	q.s.p. 1.000mL

SM

NaCl	5,8g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0g
Tris-HCl pH 7,5 (1M)	50mL
H ₂ O destilada	q.s.p. 1.000mL

Solução de sais

KCL	2,6%
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,6%
KH ₂ PO ₄	7,6%

Solução de elementos traços

Na ₂ B ₄ O ₇ .7H ₂ O	4mg%
CuSO ₄ .5H ₂ O	40mg%
FeSO ₄	1mg%
MnSO ₄ .2H ₂ O	80mg%
Na ₂ MnO ₄ .2H ₂ O	80mg%
ZnSO ₄ .7H ₂ O	80mg%

10 Apêndice 2

Oligonucleotídeos (Invitogen)	
TEF1	5' TCTCAATGGTACGCTTGTCG 3'
TEF2	5' CTTCAAGTACGCTGGGTTC 3'
TEF3	5' CACATAGGCTTGGAGGGAAC 3'
PTEF forward	5' GAATTCAGAATGATACGAAT 3'
PTEF reverse	5' GGTACCTTTGAAGGTATTAG 3'
sGFP2	5' GGTACCATGGTGAGCAAGGGCG 3'

11 Apêndice 3

Dutra V, **Nakazato L**, Broetto L, Silveira Schrank I, Henning Vainstein M, Schrank A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. ***Research in Microbiology***. 155(4):245-51.

12 Apêndice 4

Manuscrito submetido AMB-05-12707 Applied Microbiology and Biotechnology)

Luciano Nakazato, Valéria Dutra, Leonardo Broetto, Charley Christian Staats, Marilene, Henning Vainstein, Augusto Schrank Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1 α* homologous promoter.