

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALINE WEYH

**AVALIAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA TREALASE ÁCIDA ATM1
DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONSTRUÇÃO DE VETOR REGULÁVEL POR
FONTE DE CARBONO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

São Gabriel

2017

ALINE WEYH

**AVALIAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA TREALASE ÁCIDA ATM1
DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONSTRUÇÃO DE VETOR REGULÁVEL POR
FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Ciências Biológicas; Linha de Pesquisa: Genética).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

São Gabriel

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

W547a Weyh, Aline

AVALIAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA TREALASE ÁCIDA
ATM1 DE METARHIZIUM ANISOPLIAE PARA CONSTRUÇÃO DE VETOR
REGULÁVEL POR FONTE DE CARBONO / Aline Weyh.

62 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2017.

"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".

1. Promotor regulável. 2. Trealose. 3. Fungo filamentosos.
4. RT-qPCR. I. Título.

ALINE WEYH

**AVALIAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA TREALASE ÁCIDA ATM1
DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONSTRUÇÃO DE VETOR REGULÁVEL POR
FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Ciências Biológicas; Linha de Pesquisa: Genética).

Dissertação defendida e aprovada em: 28 de abril de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo (Orientador)

Laboratório Interdisciplinar – APIPAMPA (Unipampa - SG)

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

Laboratório de Proteômica Aplicada – LPA (Unipampa - SG)

Prof. Dr. Augusto Schrank

Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos – LBCMFF
(Centro de Biotecnologia – Cbiot/UFRGS)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS) em parceria com o Laboratório APIPAMPA (UNIPAMPA/SG).

Dedico este trabalho àqueles que
acreditaram em mim quando nem eu
mesma acreditava;

Dedico àqueles que regavam meus
sonhos quando eu achava que
estavam por morrer;

Dedico àqueles que me permitiram
crescer e a sua maneira me
mostraram o caminho;

Dedico à minha família, dedico a
você que agora o lê.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Juliano. Jú sinceramente não sei como aguentou me orientar por tanto tempo. Você sempre teve um carinho tão imenso que transbordava por onde passava. Sua paciência em ensinar me admira e a forma como o faz é exemplar. Mais que um grande orientador, mostrou-me como encarar os problemas e resolvê-los. Me apoiou quando mais precisei, exigiu-me quando foi necessário. És para mim um amigo inestimável. Poço de gentileza, nunca lhe faltou um sorriso estampado, sono por outro lado... mas nada lhe impediu, até quando bem ocupado, de encontrar mesmo que alguns minutinhos para nos dar um “oizinho” ou orientar de bom coração. Sou eternamente grata a você querido orientador!

Agradeço à banca por aceitarem tão prontamente avaliar este trabalho. Paulo, você sempre foi um dos meus maiores exemplos! Mostrou-me na mais pura sinceridade que precisava correr atrás de meus sonhos se desejava que fossem reais. Devo muito a você! Obrigada!

Ao querido professor Augusto me faltam palavras para agradecer. Me acolheste de bom coração e este gesto levarei para sempre. Você é muito melhor que um excelentíssimo professor! Foste para mim bem mais que um pai na ciência, me inseriu no mundo científico e muito do que sou foi com seu apoio. Sempre encontrou um tempo quando precisei, sanou minhas dúvidas me incentivando a buscar as respostas por mim mesma, acreditou em mim quando me via sem esperanças. Como uma criança, sempre buscava ser melhor para lhe deixar orgulhoso, embora nem sempre foi possível. Tenho muito apreço por você! Muito, mas muito obrigada!

Agradeço aos professores por compartilhar de bom grado seus conhecimentos sempre oferecendo o melhor de si. Admiro muito vocês e muito do que me tornei devo a vocês! Obrigada!

Agradeço à Angela, querida Angelita, pelos sábios ensinamentos, pelo enorme carinho, por dedicar-se a me ensinar tão pacientemente e pela adorável amizade que levarei sempre comigo. Obrigada!

Agradeço carinhosamente ao professor Luis Fabiano. Você parecia que adivinhava! Sempre me trouxe uma energia positiva, um sorrir que fazia falta. Compartilhava novidades, debates críticos, e até descontraídos que tornavam o dia melhor. Havia dias em que eu contava as horas para poder cevar aquele mate que

mesmo, as vezes fervido, virado, entupido – quando estava preocupada e mal concentrada – você tomava comigo sem nunca reclamar. Quando ruim, tomava, sorria e agradecia. Te agradeço muito por esse carinho! És um grande professor pois, além de ensinar regas nossos sonhos.

Agradeço aos técnicos, em especial ao Adriano (Marileno), Daiana, Adri, Aline Krolow, Ruti e Lisete. Agradeço aos funcionários da segurança, às meninas da limpeza com seus sorrisos e abraços, também à Teresinha (Tetê) e Silvinha. Sem vocês muita coisa não funcionaria! Muito obrigada!

Agradeço aos colegas, em especial carinho ao Matheus por sempre ter um chimarrão a oferecer, ao Léo pela paciência com a prof^a de primeira viagem, à Vanusa pelos cafés dos amores importados e ao Diogo e Marçal, nesta etapa final, que me prestaram grande apoio para seguir em frente.

Agradeço ao Rafael pelos vários cafés, cucas, pelas mateadas, pelas várias trocas de “figurinhas”, pelas ajudas, pela parceria de laboratório, pelos conselhos amorosos, pelos sorrisos doados e abraços de urso sempre que precisei. Muito obrigada Rafa!

Agradeço ao Kokoro, por me mostrar a importância de não desistir e o valor da humildade.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus, agradeço à minha família, fonte maior de apoio. Obrigada Osmar! Malinha que me atura e aguenta meu estresse cada vez que eu quero eliminar as coisas tecnológicas do universo, posso brigar muito com você meu irmão mas te amo! Obrigada Valmir! Querido papito você é meu eterno exemplo de calma e paciência, sempre me dizendo para pensar antes de agir, antes de falar. Mãezinha, agradecer você é como dar “bom dia”. És forte, guerreira e uma fonte ilimitada de amor dona Terezinha! Não importa a dor que sinta, sempre tens um sorriso para dar. Mãe tu és minha melhor amiga! Passamos por tantas situações juntas e unidas passaremos pelas que estão por vir. Te amo minha menina sapeca!

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

George Bernard Shaw

RESUMO

Sistemas de expressão em fungos vêm sendo utilizados em várias abordagens de análise funcional como ferramentas para alterar a expressão de genes. Em *Metarhizium anisopliae*, no entanto, poucos estudos têm sido conduzidos com relação a regiões promotoras homólogas eficientes e seu uso na construção de sistemas de expressão que possam facilitar tais abordagens. Este fungo entomopatogênico utilizado em biocontrole é amplamente conhecido por sua capacidade de infectar uma ampla gama de artrópodes de importância econômica, desde pragas agrícolas até vetores de doenças. Em seu processo infectivo, *M. anisopliae* penetra diretamente na cutícula do hospedeiro valendo-se de recursos multifatoriais que incluem a pressão mecânica exercida por apressório e a secreção de hidrolases, entre outros. Em um dos estágios de infecção, ao atingir a hemolinfa do hospedeiro, este fungo se diferencia em blastosporos e se dissemina no hospedeiro pelo sistema circulatório. A hemolinfa de artrópodes apresenta como principal componente, o dissacarídeo trealose. Para captar e utilizar este nutriente, o fungo secreta uma trealase ácida que hidrolisa a trealose em duas unidades de glicose. Em uma análise genômica, um ortólogo putativo do gene que codifica para esta hidrolase (ATM1) foi identificado em *M. anisopliae*. Todavia, poucos relatos na literatura fazem referência à região 5'UTR deste gene, assim como, elementos regulatórios que possam dar indícios da sua regulação. Sugere-se que elementos envolvidos na repressão catabólica por glicose estejam presentes, tal como elementos responsivos à trealose. A compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação de promotores é importante não apenas para o conhecimento básico do seu funcionamento, mas também para o desenvolvimento de ferramentas para estudar a função de genes. Vetores de expressão reguláveis são ferramentas moleculares úteis na investigação da função gênica e seu diferencial é permitir a regulação do promotor de forma a obter-se o controle mais preciso da expressão do gene em estudo. O promotor da trealase ácida, em estudo neste trabalho, provavelmente, somente é induzido na hemolinfa de hospedeiros o que permite o controle da expressão de genes de interesse em meios que mimetizem as condições encontradas na hemolinfa, em especial a presença de trealose. Este trabalho objetivou analisar a região promotora do gene da trealase ácida de *M. anisopliae* quanto a sua regulação por fontes de carbono. Foram construídas linhagens

contendo cassetes inseridos no genoma de *M. anisopliae* linhagem E6 contendo os genes repórter da proteína verde fluorescente, ou do inglês GFP (*green fluorescent protein*), e vermelho fluorescente (yeCherry) sob a regulação de diferentes sequências da região promotora putativa de interesse. Os transformantes foram analisados quanto à indução da expressão dos genes repórter com trealose e repressão com glicose de forma quantitativa por análise do mRNA produzido (RT-qPCR). Foi possível identificar uma região promotora mínima funcional de 750 pb que controla a expressão de genes repórter e pode ser induzida por trealose. Estes resultados demonstram que o promotor homólogo da trealase ácida de *M. anisopliae* é regulado pelas fontes de carbono testadas e oferecem uma nova ferramenta para estudos de função gênica.

Palavras-chave: Promotor regulável. GFP. yeCherry. Trealose. Indução. Repressão. Fungo filamentosos.

ABSTRACT

Fungal expression systems have been used in several functional analysis approaches as tools for altering gene expression. In *Metarhizium anisopliae*, however, few studies have been conducted regarding efficient homologous promoter and their use in constructing expression systems that may facilitate such approaches. This biocontrol entomopathogenic fungus is widely known for its ability to infect a wide range of economically important arthropod, from farming pests to disease vectors. During the infection process, *M. anisopliae* directly penetrates the host cuticle using multifactorial resources that include the mechanical pressure exerted by appressorium and the secretion of hydrolases, among others. In one of the stages of infection, when reaching the hemolymph of the host, this fungus differs into blastospores and is disseminated in the host by circulatory system. The hemolymph of arthropods has as main component, the disaccharide trehalose. To intake and use this nutrient, the fungus secretes acid trehalase, which hydrolyses trehalose into two glucose units. In a genomic analysis, a putative ortholog of the gene encoding this hydrolase (ATM1) was identified in *M. anisopliae*. However, there are few reports in literature characterizing the 5' UTR region of this gene, as well as regulatory elements that may give indications of its regulation. It is suggested that elements involved in catabolic repression by glucose are present, such as trehalose responsive elements. Understanding the mechanisms involved in promoter regulation is important not only for the basic knowledge of its functioning, but also for development tools for studying gene function. Regulable expression vectors are molecular tools useful in the investigation of gene function and their differential is to allow the regulation of the promoter in order to obtain the most precise control of the gene expression under study. The promoter of the acid trehalase, in this study probably, is only induced in host hemolymph, which allows the control of the expression of interest genes in media that mimic hemolymph conditions, especially the presence of trehalose. This work analyzed the promoter region of the acid trehalase gene of *M. anisopliae* and evaluated its regulation by carbon source. Strains containing cassettes inserted into the E6 strain of *M. anisopliae* genome containing the reporter genes green fluorescent protein (GFP) and red fluorescent (yeCherry) were obtained under the regulation of different sequences of the putative promoter region of interest. Transformants were analyzed for induction of reporter

gene expression with trehalose and repression with glucose quantitatively by mRNA analysis (RT-qPCR). Was possible to identify a minimal functional promoter region of 750 bp that controls the expression of reporter genes and may be induced by trehalose. These results demonstrate that the *M. anisopliae* homolog acid trehalase promoter is regulated by the carbon sources tested and offer a new tool for gene function studies.

Keywords: Regulatable promoter. GFP. YeCherry. Trehalose. Induction. Repression. Filamentous fungus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Trealases: análise filogenética, distribuição de motivos e distribuição de resíduos catalíticos.....	25
FIGURA 2 - Representação esquemática da região promotora putativa da trealase neutra de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
FIGURA 3 - Representação esquemática da região promotora putativa da trealase ácida de <i>Metarhizium anisopliae</i> e a estratégia para sua caracterização.....	33
FIGURA 4 - Representação esquemática e confirmação das construções GFP::BAR em pPZP.....	37
FIGURA 5 - Representação esquemática e confirmação das construções yeCherry::BAR em pPZP	40
FIGURA 6 - Representação esquemática das seis construções obtidas e incorporadas, em casos isolados, no genoma fúngico em experimentos de agrotransformação.....	41
FIGURA 7 - Níveis de expressão relativa do gene repórter GFP sob o controle das construções de diferentes tamanhos do promotor.....	43
FIGURA 8 - Níveis de expressão relativa do gene repórter yeCherry sob o controle das construções de diferentes tamanhos do promotor.....	44

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 - Relação de isolados por agrotransformação.....	42
QUADRO 1 - Relação de <i>primers</i> utilizados e sua aplicação.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
%	por cento
ANOVA	análise de variância
cDNA	sequência de DNA complementar
DEPC	dimetilpirocarbonato
DL ₅₀	dose letal a 50% da população
DNA	ácido desoxirribonucleico
g	grama
GFP	(<i>green fluorescent protein</i>) proteína verde fluorescente
kb	kilobase
M	molar
MC	meio de Cove
MCC	meio de Cove completo
min	minutos
m/V	massa por volume
mL	mililitros
MM	meio mínimo
µg	microgramas
nt	nucleotídeos
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa)
u	unidade de atividade enzimática
V/V	volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Revisão Bibliográfica.....	20
1.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> e o controle biológico.....	20
1.1.2. Trealose, Hemolinfa e Virulência.....	22
1.1.3. Trealases e Metabolização da Trealose.....	23
1.1.4. Regulação das Trealases.....	26
1.1.5. Sistemas de expressão em <i>M. anisopliae</i>	28
1.2. Justificativa.....	29
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Soluções e Meios de Cultivo.....	31
3.1.1. Meio de Cove completo - MCc.....	31
3.1.2. Meio de Cove - MC.....	31
3.1.3. Solução de Sais.....	31
3.1.4. Solução de Elementos Traços.....	31
3.1.5. Solução de Tween-80 a 0,01%.....	32
3.1.6. Solução de Glicose 4%.....	32
3.1.7. Solução de Trealose 4%.....	32
3.1.8. Água tratada com DEPC.....	32
3.2. Material Biológico.....	32
3.3. Isolamento da região promotora em três fragmentos diferentes.....	33
3.4. Construção dos cassetes.....	35
3.5. Agrotransformação de <i>M. anisopliae</i>	36
3.6. Suspensão de Esporos.....	37
3.7. Cultivo em meio indutor e repressor por fonte de carbono.....	38
3.8. Extração de RNA total de cultivos de <i>M. anisopliae</i>	38
3.9. Análise por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	39
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Construção dos cassetes.....	39
4.2. Agrotransformação de <i>M. anisopliae</i>	42
4.3. Análise por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	42
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma ciência que vem revolucionando áreas diversas e ganhando destaque econômico, movida pela constante busca de descobertas biológicas que ofertem algum recurso explorável, como a possibilidade de utilização de enzimas isoladas de organismos extremófilos (DURMONÉ *et al.*, 2017). Dentre a amplitude desta ciência, a biotecnologia microbiana ganha destaque.

Os microrganismos são frequentes alvos de estudo e, no âmbito da indústria, o setor agrícola é um dos mais abordados. O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* é um exemplo bem descrito, tratando-se de um entomopatógeno biocontrolador capaz de infectar uma vasta gama de artrópodes praga da agricultura, pecuária, além de vetores de doenças.

Com o aumento das demandas do setor agrícola, o melhoramento genético tem ganhado força na obtenção de microrganismos cada vez mais eficientes no biocontrole. Todavia, para a obtenção de microrganismos entomopatogênicos mais eficazes, o entendimento da biologia básica do sistema, ou seja, os genes e proteínas envolvidos no processo de infecção, se faz cada vez mais necessário e a busca por ferramentas que auxiliem nesta abordagem vem sendo requisitada.

A investigação da função de genes pode ser realizada utilizando vetores contendo *cassettes* de expressão específicos, construídos com regiões promotoras reguláveis cuja modulação da expressão não só facilita como aperfeiçoa a técnica. Vetores reguláveis são necessários para, por exemplo, elucidar funções gênicas isoladas, metodologias de superexpressão, inibição, e relação existente de funções gênicas com processos biológicos.

Em *M. anisopliae*, algumas regiões promotoras homólogas para elaboração de vetores de expressão foram caracterizadas e contribuíram posteriormente em trabalhos de análise de função gênica, como os promotores dos genes do fator de alongação da tradução 1 α (Ptef-1 α) e de isocitrato liase (Pma-icl) ambos constitutivos. Contudo, regiões promotoras reguláveis, que garantam o controle preciso da expressão do gene em estudo, ainda são pouco caracterizadas neste organismo.

Neste trabalho estudamos a região promotora da trealase ácida de *M. anisopliae* como potencial na elaboração de vetores reguláveis por fonte de carbono. Embora sejam encontrados poucos relatos na bibliografia sobre esta região

promotora, sabe-se que ela apresenta homologia com a região promotora da trealase ácida de *M. acridum* e possui o mesmo tipo de regulação, sendo expressa somente na hemolinfa de artrópodes, rica em trealose.

Posto isso, objetivamos contribuir com a elucidação acerca da regulação do promotor da trealase ácida de *M. anisopliae*, visando a elaboração de ferramentas para estudo da função de genes com potencial participação no processo de infecção de hospedeiros ou na construção de linhagens melhoradas geneticamente.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. *Metarhizium anisopliae* e o controle biológico

Isolado e descrito inicialmente no final do século XIX por Metschnikoff, este fungo filamentosos é amplamente estudado por sua capacidade de infectar e ser letal a cerca de 300 espécies de artrópodes, abrangendo de insetos a ácaros, com distribuição geográfica mundial (ROBERTS & ST. LEGER, 2004).

M. anisopliae foi descrito por infectar artrópodes praga de importância econômica na agricultura e pecuária como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Curculio nucum*, *Schistocerca gregaria*, *Frankliniella occidentalis*, *Manduca sexta*, além de vetores de doenças tais como *Aedes aegypti*, *Triatoma infestans*, *Glossina morsitans* e *Anopheles stephensi* (SALAS *et al.*, 2016; FALVO *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2016; DUAN *et al.*, 2009; LUZ, RODRIGUES, ROCHA, 2012; MANIANIA *et al.*, 2013; BLANFORD *et al.*, 2012). Embora o uso de microrganismos para o controle biológico de pragas e vetores de doenças tenha sido proposto há mais de um século, apenas recentemente o potencial das vantagens desta prática têm atingido uma escala comercial (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010). *Metarhizium* vem sendo comercializado principalmente de quatro maneiras: cultivado em arroz inteiro, arroz triturado, em conídios puros e em formulação oleosa, sendo que, embora a produção com uso de substratos sólidos à base de cereais ainda seja muito onerosa e demande maior manipulação, pode ser igualmente e economicamente viável (GOTTI, 2016).

O motivo pelo qual houve pouca aceitação das estratégias de controle biológico incluem a morte mais lenta do hospedeiro, a incapacidade de identificar cepas ativas em baixas doses e resultados instáveis em comparação com os produtos químicos com os quais eles competem (GRESSEL, 2001) visto que, por

exemplo, diferente do controle químico, são mais influenciados por fatores climáticos e ambientais.

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética, no entanto, tornou possível melhorar significativamente a eficácia do controle biológico (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2015). Tais avanços foram obtidos a partir de novos conhecimentos derivados de estudos básicos da biologia molecular e genômica desses patógenos somado ao desenvolvimento técnico que permitiu ampliar a expressão gênica e o uso de genes exógenos que codificam proteínas inseticidas para melhorar a eficiência (ST. LEGER & WANG, 2010). Dentre as melhorias derivadas de manipulações genéticas dos fungos entomopatogênicos descritos na literatura, a expressão de genes endógenos que codificam enzimas de degradação da cutícula, a expressão de genes exógenos que codificam neurotoxinas específicas de insetos e o desenvolvimento de proteínas e/ou peptídeos reguladores que aumentam a virulência microbiana alterando a fisiologia e/ou danificando os tecidos dos hospedeiros, são abordagens citadas por melhorar a virulência fúngica (FANG *et al.*, 2005; WANG & ST LEGER 2007; PENG & XIA 2014, 2015; FAN *et al.*, 2012).

Dada a crescente aceitação, por parte do público, de culturas geneticamente modificadas expressando toxinas de *Bacillus thuringiensis*, a aplicação em campo de microrganismos geneticamente modificados parece promissora se forem tomadas precauções visando garantir a aceitação social através de análise rigorosa e criteriosa de risco e benefício (ST. LEGER & WANG, 2010). Valer-se do biocontrole exercido por fungos, dentre outras vantagens, reduz a probabilidade dos artrópodes praga adquirirem resistência, quando comparado aos pesticidas químicos, devido ao fato de a infecção ser um processo multifatorial (HE & XIA, 2008).

O ciclo infectivo de *M. anisopliae* é bem descrito na literatura e compreende, resumidamente, as etapas de: adesão de conídios à cutícula de seu hospedeiro, germinação e desenvolvimento dos conídios, diferenciação do tubo germinativo em apressório, penetração da cutícula, colonização da hemolinfa com a diferenciação da extremidade distal das hifas em blastosporos, extrusão de novos corpos hifais e disseminação dos conídios formados para nova infecção (ARRUDA *et al.*, 2005).

Atingindo a hemolinfa, os blastosporos promovem a disseminação do fungo e o entomopatógeno burla o sistema de defesa inata do hospedeiro (que inclui fagocitose, encapsulamento, melanização, liberação de peptídeos antimicrobianos e

espécies reativas de oxigênio), e se adapta ao ambiente da hemolinfa que é caracterizado por uma alta pressão osmótica (ZHANG & XIA, 2009).

1.1.2. Trealose, Hemolinfa e Virulência

A trealose é um dissacarídeo formado por dois resíduos de α -glicose não redutores, um carboidrato encontrado em diversos organismos (ELBEIN, 1974; ELBEIN, 2003). Este dissacarídeo possui a característica de conferir resistência a pressões fisiológicas extremas, tais como concentrações elevadas de sal, calor e frio, e confere proteção em alta osmolaridade (SCHWARZ & DIJCK, 2016). Observa-se a presença de trealose em organismos capazes de resistir à desidratação completa, por exemplo, evento este conhecido por anidrobiose, e é comum em tardígrados, nematoides, células de leveduras e esporos de fungos (CROWE *et al.*, 1998; TAPIA *et al.*, 2015; ERKUT & KURZCHALIA, 2015). O acúmulo de trealose mostrou, ainda, ser eficiente na proteção contra espécies reativas de oxigênio (BENAROUDJ *et al.*, 2001).

Em artrópodes, a trealose é o açúcar mais abundante na hemolinfa (podendo chegar a cerca de 90% do conteúdo total de carboidratos) sendo a principal fonte de nutrientes encontrada pelo fungo entomopatogênico durante a infecção em seus hospedeiros (WYATT & KALF, 1957). Para explorar os recursos encontrados, o fungo, utiliza-se da secreção de hidrolases, em especial a trealase ácida [EC 3.2.1.28], que hidrolisa a trealose em duas unidades de glicose (PENG *et al.*, 2015). A redução da trealose na hemolinfa é danosa ao hospedeiro, uma vez que é a sua principal fonte energética e também atua na regulação da pressão osmótica. Ao observar o processo infectivo de *Metarhizium* sobre gafanhotos da espécie *Locusta migratoria manilensis*, percebe-se a presença de uma trealase fúngica na hemolinfa deste hospedeiro (ZHAO *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2002). Este relato é esperado uma vez que a competição por nutrientes essenciais é um dos principais efeitos durante as interações patógeno-hospedeiro, visto que pode determinar a dominância relativa de patógenos em um nicho de hospedeiros (IYER & CAMILLI, 2007). Desta forma, a virulência de *Metarhizium* é otimizada quando sua capacidade de hidrolisar a trealose da hemolinfa do hospedeiro infectado é melhorada. Relata-se que o crescimento fúngico se torna mais eficiente e a DL_{50} é reduzida em mais de oito vezes em comparação com uma linhagem que hidrolisa trealose normalmente (PENG *et al.*, 2015).

Em sua maioria, os artrópodes, possuem mais trealose livre na hemolinfa que glicose (WYATT, 1967). Esta trealose é requerida em atividades que demandam grandes quantidades energéticas como voo ou movimentos peristálticos, desta forma, a atividade da trealase de artrópodes está relacionada de acordo com suas necessidades energéticas em um determinado instante (WEGENER *et al.*, 2010; MITSUMASU *et al.*, 2005; LIEBL *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2015). Observa-se porém, que a atividade da trealase do artrópode cessa após a infecção com algum patógeno, período no qual a alimentação e movimentos não estão presentes (PENG *et al.*, 2015). Os níveis de glicose encontrados em insetos infectados são comparáveis aos níveis encontrados em insetos não infectados, porém os níveis de trealose decaem no processo infectivo visto que a glicose livre da hemolinfa é mantida através da hidrólise da trealose que é sintetizada em taxa inferior à velocidade que é consumida (MAYACK & NAUG, 2010). A hidrólise, neste caso, provém da atividade da trealase do patógeno já que a do hospedeiro encontra-se inativa. O esgotamento energético resulta na morte do hospedeiro e desenvolvimento do patógeno.

1.1.3. Trealases e Metabolização da Trealose

A trealose é um dissacarídeo conservado ao longo da evolução e sua hidrólise é efetuada pela enzima trealase [E.C.3.2.1.28], uma glicosidase específica que tem a trealose como único substrato (MAICAS *et al.*, 2016). O número de genes de trealase presentes no genoma de espécies de fungos pode variar e inclui basicamente dois tipos: trealase ácida e trealase neutra (PERFECT *et al.*, 2016). A trealase cliva a ligação α,α -1,1 glicosídica da trealose para produzir duas moléculas de glicose (MAICAS *et al.*, 2016).

De modo geral, as trealases se diferenciam com base no mecanismo de regulação, localização celular, propriedades catalíticas, sequência de aminoácidos e configurações tridimensionais. São consideradas neutras quando exibem atividade máxima a pH neutro (6,7 – 7,0), citosólicas e de menor estabilidade térmica, ativadas por cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}), inibidas por Mg^{2+} , e reguladas por proteínas cinases dependentes de AMPc (PKA). Por sua vez, as trealases ácidas possuem pH ótimo entre 4,5 – 5,0, estão localizadas dentro dos vacúolos ou associadas à parede celular externa e a sua atividade catalítica é independente tanto dos cátions divalentes quanto da fosforilação da PKA (DESTRUELLE *et*

al., 1995; XIA *et al.*, 2002; THEVELEIN, 1988; ELBEIN, *et al.*, 2003; SAN MIGUEL & ARGÜELLES, 1994; AQUINO *et al.*, 2005; JORGE *et al.*, 1997). Enquanto as trealases neutras hidrolisam o *pool* intracelular de trealose, o papel fisiológico das trealases ácidas permanece indeterminado. Sabe-se que são consideradas mais estáveis e altamente específicas, são responsáveis pela hidrólise da trealase externa e evidências recentes sugerem que elas são necessárias para que as leveduras cresçam em trealose exógena, sendo reguladas por repressão catabólica (PARROU *et al.* 2005; AMARAL *et al.*, 1997; JORGE *et al.*, 1997; PEDREÑO *et al.*, 2004; SAN MIGUEL & ARGÜELLES, 1994).

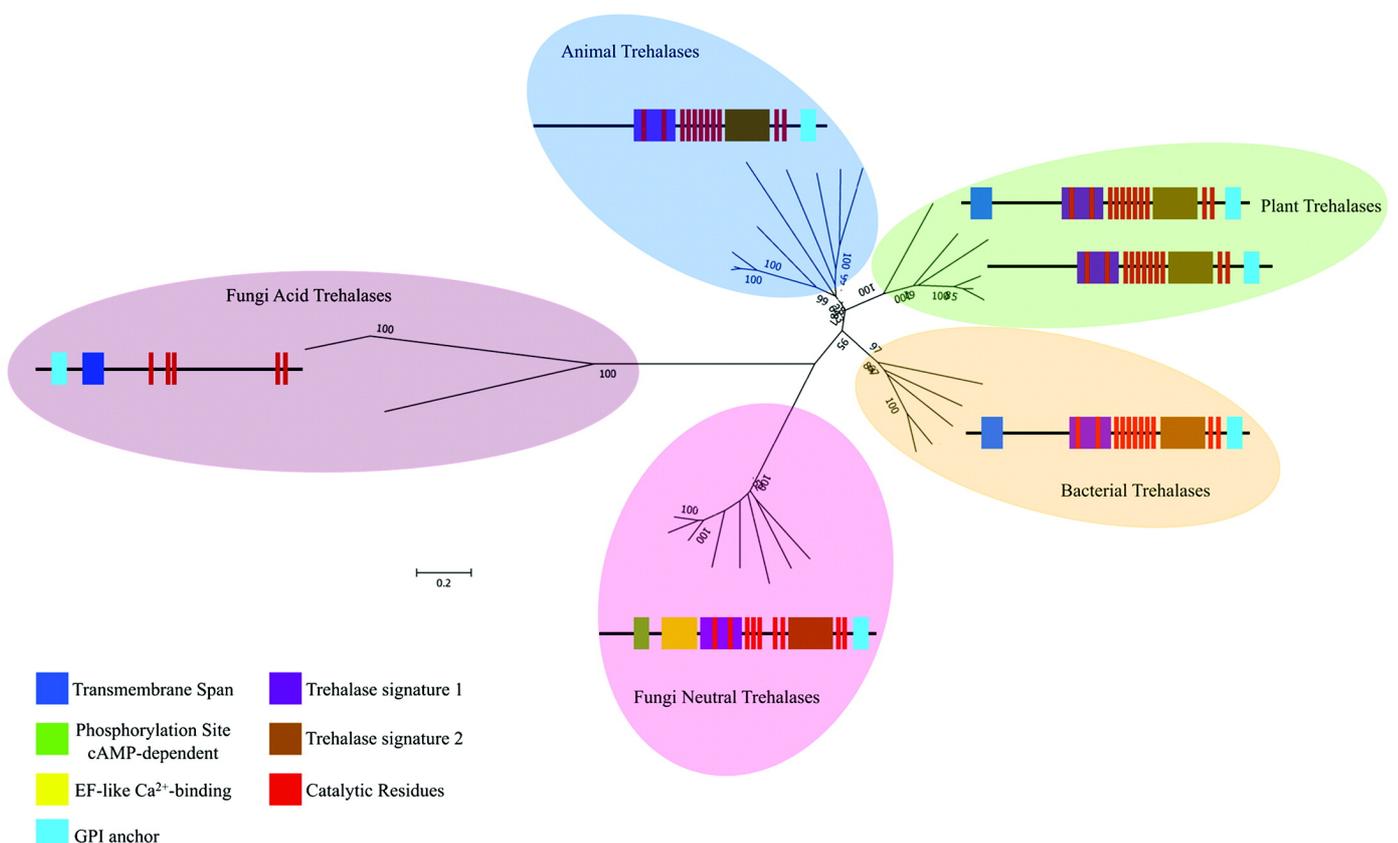
Na literatura, a presença de trealases fúngicas é comum e estão descritas em diversos fungos de importância econômica, médica e agentes de biocontrole, tais como: *S. cerevisiae*, *Candida sp.*, *Metarhizium sp.*, *Beauveria sp.*, dentre outros (DIVATE *et al.*, 2016; PERFECT *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2013).

Observando a influência dessa hidrolase na virulência de algumas espécies, constata-se que a trealase neutra não possui tanta influência quanto a ácida e, pelo mesmo motivo, inibidores da trealase ácida vêm sendo estudados como potenciais fungicidas de espécies patogênicas humanas como *Candida albicans* e *Cryptococcus* (PERFECT *et al.*, 2016). Em contrapartida, a otimização da ação destas hidrolases, em especial da trealase ácida, pode ser a chave para obtenção de microrganismos com potencial de biocontrole mais eficaz, com adaptabilidade e virulência mais acelerados.

Em uma investigação mais exploratória da origem e sequência das trealases, Barraza e Sánchez (2013), com base em dados filogenéticos, dividem as trealases em três ramos principais que compreendem: bactérias, plantas e animais, e aqueles de origem fúngica (Figura 1). Eles apontam para uma origem bacteriana das trealases comparando suas estruturas cristalográficas e, analisando a sequência de aminoácidos, encontram seis motivos consenso além do domínio catalítico, que são: a extensão transmembrana (LFFFFFFFLCFSFTTSM), um local de fosforilação dependente de cAMP (RRXS), um motivo de ligação ao Ca^{2+} EF-like (DTXGDXQITIXD), motivos sinais 1 e 2 (PGGRFXEXYXWDXY e QWDXPX[G/A]W[P/A/S]P respectivamente) e o motivo de ancoramento à membrana de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (CRTNYGYSA) (Figura 1).

Tem sido relatado que as atividades da trealase neutra e ácida são baixas em células de levedura durante a fase de crescimento exponencial com açúcares fermentáveis tais como glicose, manose ou galactose, mas elevadas durante o crescimento em fase estacionária após a glicose ter sido esgotada (WINKLER *et al.*, 1991). Da mesma forma, em outro estudo, a expressão dos genes para estas enzimas parece ser baixa em células em crescimento exponencial, em comparação com células em fase estacionária, sugerindo que estes genes são reprimidos por glicose (NWAKA *et al.*, 1995; ELBEIN, 2003). Em um estudo com *C. albicans* observou-se que a atividade da trealase ácida, durante o catabolismo da trealose atingiu valores três vezes maiores dos observados durante o crescimento em glicose (ZILLI *et al.*, 2015). E em uma pesquisa realizada com *Metarhizium rouxii*, a trealase ácida encontrada exibia uma temperatura ótima a 45 °C sendo reprimida por glicose e induzida por trealose exógena (JORGE *et al.*, 1997).

Figura 1 – Trealases: análise filogenética, distribuição de motivos e distribuição de resíduos catalíticos. A escala representa os comprimentos de ramos estimados (método de *neighbor-joining*, com 1.000 repetições de *bootstrap*). Três grupos filogenéticos são destacados e os motivos correspondentes em cada grupo são mostrados na legenda.



Fonte: BARRAZA & SÁNCHEZ (2013, p.24778-3)

Tal dependência da expressão do gene da trealase na presença de glicose é típico de genes que estejam sob o controle de repressão catabólica e sugere-se um papel para esta enzima no metabolismo da glicose (NWAKA & HOLZER, 1998). De acordo com esta repressão catabólica da expressão da trealase, as células em fase estacionária de levedura têm níveis aumentados de trealose citoplasmática e também o aumento dos níveis de atividade de trealase (ELBEIN, 2003; PEDREÑO *et al.*, 2004).

Em outro exemplo, relata-se que os níveis de trealose se elevam em várias células quando expostas a uma variedade de estresses ambientais, desta forma em alguns casos a trealase pode, também, desempenhar um papel na remoção de trealose trazendo a célula de volta à homeostasia (ELBEIN, 2003).

1.1.4. Regulação das trealases

Em estudos anteriores, observando-se o promotor do gene da trealase neutra em *Saccharomyces cerevisiae*, elementos responsivos ao estresse (STREs) foram identificados (Figura 2), bem como estudados quanto ao envolvimento no controle da expressão basal do gene *NTH1* em situações de estresse osmótico, por calor e indução durante fase diáuxica (ZÄHRINGER, THEVELEIN & NWAKA, 2000; NWAKA & HOLZER, 1998). Além disso, uma maior ligação dos fatores de transcrição Msn2 e Msn4, que regulam a resposta geral a estresse, também foi identificada neste promotor (ZÄHRINGER, THEVELEIN & NWAKA, 2000). Embora tenha sido encontrada uma relação destes elementos na indução da expressão da trealase neutra, os pesquisadores acreditam que há, ainda, outros elementos envolvidos no processo de indução. Já para a região promotora da trealase ácida relatou-se uma possível regulação por fonte de carbono, pois a atividade da enzima era alta quando em cultivo com glicerol ou etanol, mas indetectável em glicose como fonte de carbono (NWAKA & HOLZER, 1998).

Figura 2 - Representação esquemática da região promotora putativa da trealase neutra de *Saccharomyces cerevisiae*. No esquema são representadas as localizações das STREs descritas em trabalhos anteriores (ZÄHRINGER, THEVELEIN & NWAKA, 2000; NWAKA & HOLZER, 1998).



Fonte: Adaptado de ZÄHRINGER, THEVELEIN & NWAKA, 2000; NWAKA & HOLZER, 1998

A glicose mostrou ser antagonista na ação e concentração de ambas hidrolases e, ainda, acredita-se que as trealases não atuem de forma simultânea e operacional dentro da célula. A trealase neutra teria uma ação mais rápida em uma hidrólise inicial em resposta ao estresse, enquanto a ácida teria sua ação ampliada no decaimento da primeira em esgotamento da glicose, sendo secretada e buscando recursos nutricionais externos à célula (SAN MIGUEL & ARGÜELLES, 1994).

Com estes dados, supõem-se que a trealase ácida é alvo claro de regulação por fonte de carbono. Contudo, a região promotora deste gene ainda não foi caracterizada, especialmente em *M. anisopliae*. O que se tem descrito é que esta região apresenta homologia com a região promotora da trealase ácida de *M. acridum* (ZHAO *et al.*, 2006) e sugere-se que hajam elementos de repressão catabólica por glicose (NKAWA *et al.*, 1995) bem como elementos responsivos a trealose (XIA *et al.*, 2002).

Em uma abordagem mais específica, com predições computacionais realizadas por Junges (2010), foi possível detectar alguns dos elementos canônicos presentes em promotores eucarióticos. Utilizando a ferramenta FGENESH, detectou-se a presença de um potencial TATA-box localizado a 283 pb a montante do sítio de início da tradução. A jusante deste sítio e a 245 pb a montante do ATG, pode ser encontrado um potencial sítio de início da transcrição (SIT). Foi detectada a sequência CAAT-box, sítio de ligação ao fator de transcrição C/EBP (CAATT-box/Enhancer Binding Protein). E o estudo demonstra, ainda, a presença de três sítios de ligação ao fator CREA (CCCCA/GC) preditos, o qual medeia a repressão catabólica por fonte de carbono localizados a 575 pb a montante do SIT na fita senso e a 540 pb e 75 pb a montante do SIT na fita anti-senso.

1.1.5. Sistema de expressão em *M. anisopliae*

No intuito de investigar a função gênica, ferramentas moleculares são desenvolvidas para facilitar este processo. Em fungos, vetores de expressão são amplamente empregados. O primeiro relato sobre vetor de expressão utilizado em *M. anisopliae* foi o plasmídeo pNOM102 (ST LEGER *et al.*, 1995), contendo o gene que codifica uma β -glicuronidase (*gusA*) de *Escherichia coli*, utilizado como marcador molecular para estudos microbiológicos ambientais. A região codante foi clonada sob controle do promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato (*PgpdA*) e a região terminadora do gene *trpC* (*TtrpC*) de *Aspergillus nidulans*. Outros vetores, como pMAPR-1 e p324-Chit1, com os mesmos elementos de regulação também são citados na literatura (FANG *et al.*, 2009; PUNT *et al.*, 1990; ST LEGER *et al.*, 1996).

NAKAZATO *et al.* (2006) utiliza pela primeira vez em *M. anisopliae* o promotor homólogo e constitutivo do gene do fator de alongamento de tradução 1 α (*tef1- α*) tendo como genes repórter GFP e BAR expressando os fenótipos de fluorescência e resistência a glifosinato de amônio respectivamente. Mais tarde, BOLDO *et al.* (2009) também utiliza para a construção do *cassette* de superexpressão do gene *chi2* o promotor do gene *tef1- α* e terminador *trpC*.

Recentemente foi descrito a utilização do promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Pmagpd*) de *M. acridum*, que, comparado com *PgpdA* de *Aspergillus nidulans*, apresentava menor sequência e atividade significativamente maior em *M. acridum* (CAO *et al.*, 2012). Estudos foram realizados, também, com o promotor do gene de isocitrato liase de *M. anisopliae* (*Ma-icl*) usando como marcador a proteína fluorescente vermelha mCherry (PADILLA-GUERRERO *et al.*, 2011).

Regiões promotoras reguláveis, que garantam o controle preciso da expressão do gene em estudo, ainda são pouco caracterizadas neste organismo. Detém-se o conhecimento do promotor induzível de tipo 1 do colágeno de *Metarhizium* (PMcl1) (WANG & ST. LEGER, 2007). Contudo, são necessários promotores mais reguláveis para condições experimentais específicas (ZHOU *et al.*, 2014).

1.2. JUSTIFICATIVA

Como base no exposto acima, sistemas de expressão em fungos vem sendo utilizados em diversas abordagens, desde a caracterização funcional de genes à expressão de proteínas heterólogas. Em *M. anisopliae*, entretanto, percebe-se a carência de estudos com regiões promotoras homólogas reguláveis eficientes e a utilização destas na construção de sistemas de expressão que possam facilitar o controle da expressão de genes alvo.

Como observado, os promotores descritos como homólogos de *M. anisopliae*, até o momento, são os mencionados anteriormente PTef (NAKAZATO *et al.*, 2006) e PMa-icl (PADILLA-GUERRERO *et al.*, 2011), ambos de caráter constitutivo e PMcl1 (WANG & ST. LEGER, 2007) de caráter induzível. Todavia, ao buscar-se compreender a função de um determinado gene, a expressão não regulada e constante, derivada do uso de promotores constitutivos, pode não ser a melhor abordagem. Determinadas proteínas produzidas em excesso podem ser citotóxicas e mascarar fenótipos ou impedir o desenvolvimento celular. Da mesma forma, a deleção gênica pode ser letal dependendo do gene excluído. Assim, a utilização de promotores que permitam a modulação da expressão dos genes de interesse é uma forma mais adequada e precisa para estudos da função de genes. Evidencia-se a importância de estudos com regiões promotoras de natureza regulável, tal qual supõem-se ser o promotor do gene da trealase ácida neste organismo e abordado neste trabalho, pois, promotores reguláveis permitem um melhor controle da expressão de genes em estudo por indução ou repressão do mesmo gene sob diferentes condições de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterização da regulação da região promotora do gene da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* e construção de vetores para análise funcional de genes baseadas no promotor caracterizado.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir vetores de expressão regulada utilizando diferentes tamanhos do promotor da trealase ácida de *M. anisopliae*;
- Produzir transformantes contendo os constructos;
- Cultivar as linhagens selvagens e transformadas de *M. anisopliae*, em meio indutor e repressor;
- Avaliar a expressão dos genes repórteres por PCR quantitativo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Soluções e meios de cultivo

3.1.1. Meio de Cove completo – MCc (COVE, 1966)

Nitrato de Sódio (NaNO_3)	- 0,6% (m/V)
Glicose	- 1% (m/V)
Peptona	- 0,2% (m/V)
Extrato de Levedura	- 0,05% (m/V)
Caseína Hidrolisada	- 0,15% (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar em autoclave. No momento de uso adicionar 2% de Solução de Sais (ver item 3.1.3.) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (ver item 3.1.4.) estéril. Para meios sólidos adicionar 1,5% de ágar no preparo do meio.

3.1.2. Meio de Cove – MC

Nitrato de Sódio (NaNO_3)	- 0,6% (m/V)
Glicose	- 1% (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar em autoclave. No momento de uso adicionar 2% de Solução de Sais (ver item 3.1.3.) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (ver item 3.1.4.) estéril. Para meios sólidos adicionar 1,5% de ágar no preparo do meio.

3.1.3. Solução de Sais

Cloreto de Potássio (KCl)	- 2,6% (m/V)
Sulfato de Magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	- 2,6% (m/V)
Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)	- 7,6% (m/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar por autoclavagem.

3.1.4. Solução de Elementos Traços

Borato de Sódio heptaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	- 0,004% (m/V)
Sulfato de Cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	- 0,004% (m/V)
Sulfato de Ferro (FeSO_4)	- 0,0001% (m/V)
Sulfato de Manganês diidratado (MnSO_4)	- 0,08% (m/V)

Molibdato de Sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - 0,08% (m/V)

Sulfato de Zinco heptaidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,08% (m/V)

Adicionar HCl concentrado até completa dissolução dos sais. Esterilizar por autoclavagem.

3.1.5. Solução de Tween-80 0,01% (V/V)

Tween-80 - 0,01% (V/V)

Dissolver em água destilada e esterilizar por autoclavagem.

3.1.6. Solução de glicose 4% (m/V)

Glicose - 4% (m/V)

Dissolver em água MilliQ e esterilizar por passagem em filtro 0,22 μm .

Armazenar em temperatura ambiente.

3.1.7. Solução de trealose 4% (m/V)

Trealose - 4% (m/V)

Dissolver em água MilliQ e esterilizar por passagem em filtro 0,22 μm .

Armazenar em temperatura ambiente.

3.1.8. Água tratada com DEPC

DEPC - 0,1% (V/V)

DEPC foi adicionado em água MilliQ e mantido durante 16 h a 37 °C. Após este período é esterilizada por autoclavagem.

3.2. Material Biológico

A linhagem selvagem *M. anisopliae* var. *anisopliae* E6 utilizada nos experimentos foi originalmente isolada do cercopídeo *Deois flavopicta* (Homoptera) no estado do Espírito Santo, Brasil, e gentilmente cedida pelo Prof. João Lúcio Azevedo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

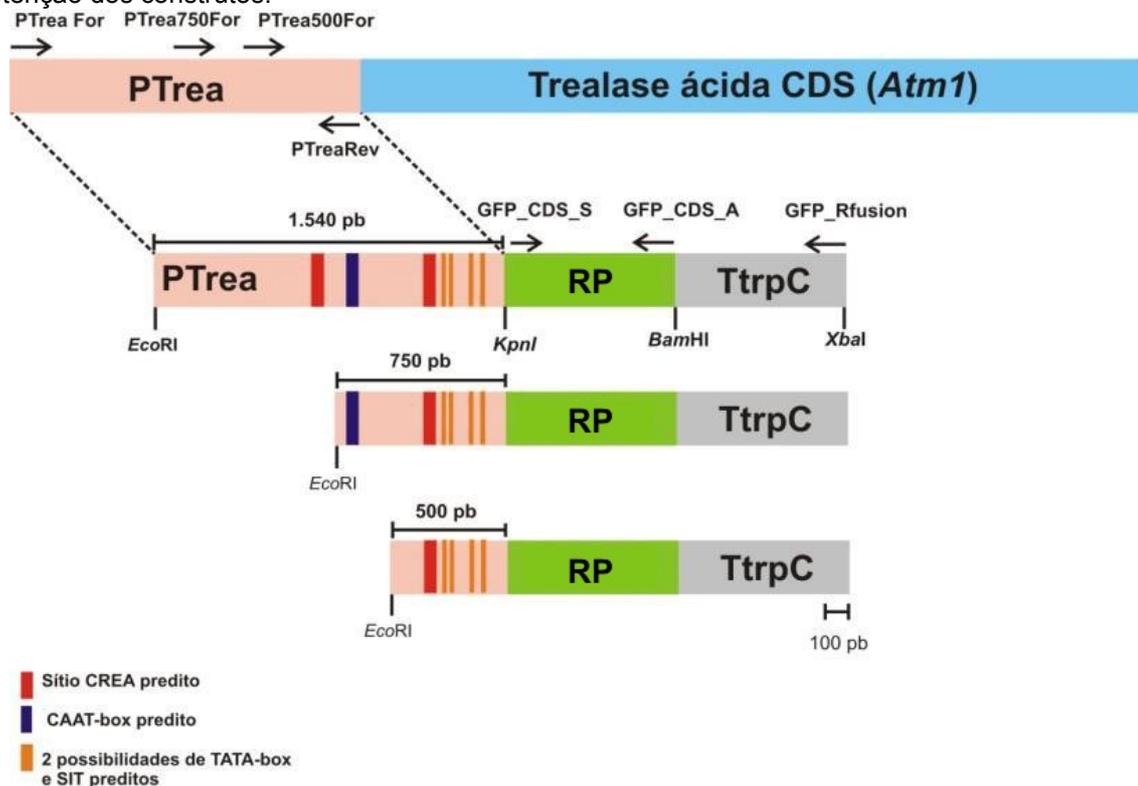
Células de *Escherichia coli*, linhagem TG2 e DH5 α foram preparadas para eletrocompetência ou quimiocompetência e utilizadas como hospedeiras dos vetores construídos neste estudo. Foram utilizados a linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* e o vetor binário pPZP201BK (COVERT *et al.*, 2001) neste trabalho em

protocolos de agrotransformação. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência.

3.3. Isolamento da região promotora em três fragmentos diferentes

Após o crescimento do fungo em meio MCc líquido, o DNA micelial foi extraído e utilizado como molde para isolamento da região promotora de interesse através da PCR usando os *primers* PTrea (Quadro 1). Para outras finalidades de clonagem, estes *primers* têm sítios para as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI* em suas extremidades. As reações de PCR foram realizadas utilizando Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Optamos por isolar três fragmentos promotores de distintos comprimentos, com o objetivo de identificar a sequência mínima funcional: 1.540 pb, 750 pb e 500 pb (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* e a estratégia para sua caracterização. As setas indicam a posição e os sítios de anelamento dos *primers* (ver Quadro 1) e são demonstrados os três fragmentos de diferentes comprimentos gerados: 1.540 pb, 750 pb e 500 pb. Estes fragmentos foram clonados à montante da sequência codificante repórter (RP), seja da proteína verde fluorescente (GFP) ou vermelho fluorescente (yeCherry) para regular sua transcrição de modo a avaliar a região promotora e caracterizar a sequência mínima funcional. Nesta imagem são mostradas, ainda, as localizações dos elementos reguladores preditos por Junges (2010) e os sítios de digestão enzimáticos utilizados para obtenção dos construtos.



Fonte: O autor

Quadro 1 – Relação de primers utilizados e sua aplicação.

Primer	Sequência (5' - 3')	Propósito
PTreaFor	GAATTCGCGCCATACCGAGAGCTGC	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 1.540 pb
PTrea750F _{or}	GAATTCGGTTGGCGATAAGAGA	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 750 pb
PTrea500F _{or}	GAATTCACAGCACAGCTTGTGAG	Amplificação da região promotora da trealase ácida de 500 pb
PTreaRev	GGTACCGTTGCGAGTCCCGGCTCGA	Amplificação da região promotora da trealase ácida
yeCherryFor	GGTACCACTAGTATGGTAAGTAAG	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry
yeCherryRev	GGATCCTTATTTGTA CAATTCGTC	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry
GFP_CDS_A	GGATTCGGGTTACTTGTACAGCTCG	Amplificação da região codante do gene repórter GFP
GFP_CDS_S	GGATCCGGAATGGTGAGCAAGGGCG	Amplificação da região codante do gene repórter GFP
GFP_Rfusion	CTGCAGGATTACCTCTAAACAAGTGACCTGTGCAT	Amplificação dos cassetes
Oligo_dT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTT	Utilizado na síntese de cDNA
GFP_QPCR_F	GACAACCACTACCTGAGCAC	Amplificação da região codante do gene repórter GFP em RT-qPCR
GFP_QPCR_R	CAGGACCAATGTGATCGCG	Amplificação da região codante do gene repórter GFP em RT-qPCR
YECERRY_QPCR_F	AAAGTACACATGGAGGGAAGC	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry em RT-qPCR
YECERRY_QPCR_R	GGGTTCCCTTCGTATGGTCTAC	Amplificação da região codante do gene repórter yeCherry em RT-qPCR
Ma_actinqPCRF	ACCGTGAGAAGATGACCCAGA	Amplificação da região codante para actina em RT-qPCR
Ma_actinqPCRR	GAGCAATGGCTGGAGGAAGAG	Amplificação da região codante para actina em RT-qPCR

3.4. Construção dos cassetes

Os fragmentos promotores amplificados por PCR foram purificados a partir de gel de agarose utilizando PureLink (Life Technologies) e clonados em vector pUC18 digerido com as mesmas enzimas de restrição contidas em suas extremidades (*EcoRI* e *KpnI*). As construções foram confirmadas por clivagem e PCR passando a ser denominado pUC18::PTrea.

Isolou-se a região contendo a sequência de codificação da GFP ligada ao terminador TrpC do vector pPZP::GFP::BAR, clivado com as enzimas *KpnI*, localizado no início de GFP, e *XbaI* no fim de TrpC. Este fragmento foi também purificado e subclonado em pUC18::PTrea igualmente clivado com as enzimas *KpnI* e *XbaI*. Esta construção foi realizada para os três fragmentos promotores, resultando em três vetores, que após confirmação por PCR e clivagem foram renomeados TreaG (para o fragmento promotor de 1.540 pb), Trea750G (750 pb) e Trea500G (500 pb).

Para a amplificação da região codante yeCherry, utilizou-se como molde o plasmídeo YAP1 mantido no laboratório Cbiot/UFRGS e os oligonucleótidos yeCherryFor e yeCherryRev contendo os locais para as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI* (Quadro 1). O fragmento amplificado foi purificado, clonado em pUC18 e depois de confirmado, clivado novamente com as enzimas *KpnI* e *BamHI* para obter fragmentos com extremidades coesivas e prosseguir com nova subclonagem.

Os vetores contendo os cassetes para expressão da GFP foram clivados com *KpnI* e *BamHI* para substituição da região codificadora do gene repórter GFP por yeCherry. Os vetores yeCherry foram nomeados Trea_yeC (para o maior fragmento promotor de 1.540 pb), Trea750_yeC (750 pb) e Trea500_yeC (500 pb).

Os cassetes de expressão GFP foram isolados a partir de pUC18 por digestão com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, purificados e subclonados em vetor pPZP::BAR pré-clivado com as mesmas enzimas (Figura 4). O vetor pPZP::BAR contém a sequência responsável por conferir resistência a herbicidas que apresentam glifosinato de amônio como princípio ativo e codifica uma fosfinotricina acetiltransferase (PAT), servindo como marcador de seleção para transformantes. Estes vetores foram renomeados TreaGB, Trea750GB e Trea500GB para os promotores PTrea de 1.540, 750 e 500 pb respectivamente, como mostrado na Figura 4 e Tabela 1.

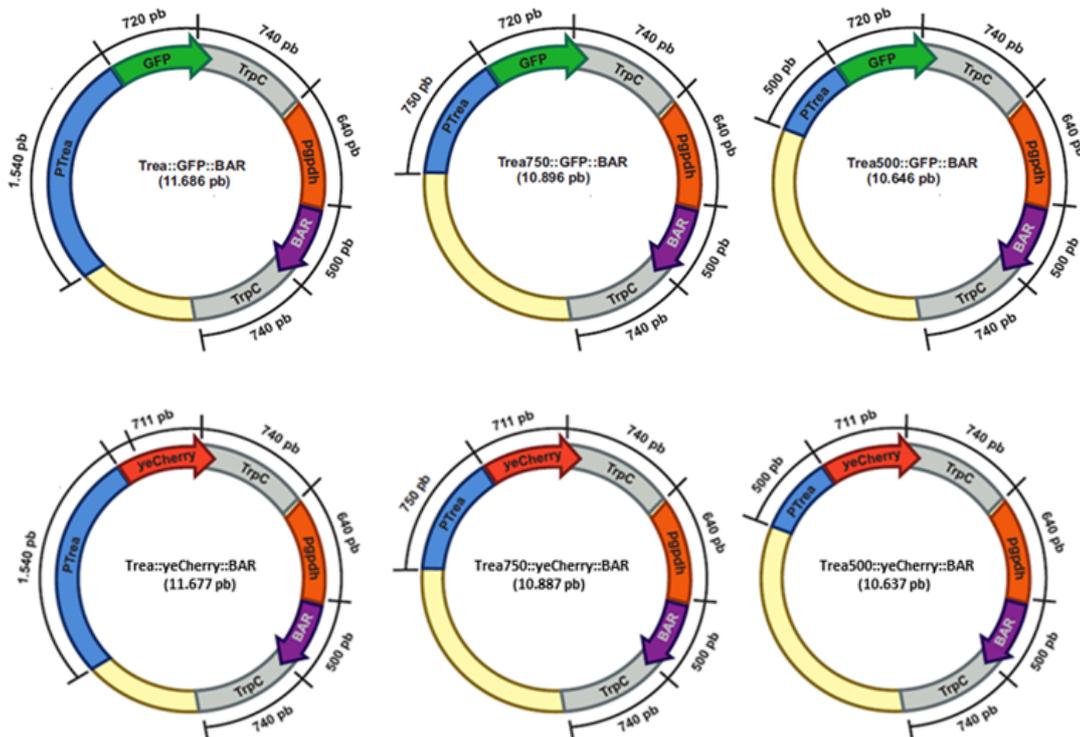
Para obtenção de vetores de expressão para agrotransformação contendo o gene repórter *yeCherry*, o isolamento do cassete deste foi realizado por amplificação dos construtos anteriormente obtidos em pUC18. Desta forma, utilizamos os *primers* PTrea senso da região promotora de interesse e o *primer* antisenso GFP-Rfusion (Quadro 1), que anela no final do terminador TrpC. O cassete amplificado foi purificado, tratado com as enzimas de modificação *Klenow* e T4 DNA polimerase (Fermentas) para então ser subclonado em vetor pZP::BAR pré-clivado com *StuI*, de sítio único, e tratado com a enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) conforme recomendações do fabricante. Estes vetores, após confirmação por PCR e clivagem, foram nomeados Trea_yeCB (para o fragmento de promotor de 1.540 pb) Trea750_yeCB (para 750 pb) e Trea500_yeCB (500 pb) como mostrado na Figura 4.

As construções realizadas neste estudo totalizaram seis cassetes diferentes: três tendo GFP por gene repórter e três contendo *yeCherry*. Por conseguinte, cada tamanho do fragmento promotor em estudo possui duas construções com diferentes genes repórteres (Figura 4). Os vetores construídos foram transformados por eletroporação ou quimiotransformação em células de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes ou quimiocompetentes e reconfirmados por clivagem tendo por molde DNA obtido de extração plasmidial.

3.5. Agrotransformação de *M. anisopliae*

A transformação mediada por *A. tumefaciens* de *M. anisopliae* foi realizada como anteriormente descrito (STAATS *et al.*, 2007). A estirpe de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário recombinante gerado foi co-cultivada com esporos de *M. anisopliae* em igual proporção. A triagem dos transformantes foi realizada por PCR do gene repórter. Linhagens transformadas expressando a proteína GFP ou a proteína *yeCherry* foram obtidas e mantidas em MC sólido a 28°C.

Figura 4 - Representação esquemática das seis construções obtidas e incorporadas, em eventos isolados, no genoma fúngico em experimentos de agrotransformação. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação TrpC, em verde a CDS para proteína verde fluorescente GFP, em vermelho a CDS para proteína vermelho fluorescente yeCherry, em roxo o marcador que confere resistência a glifosinato de amônio e em laranja o promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo está representado vetor pZP com 6.806 pb.



Fonte: O autor

3.6. Suspensão de esporos

Para a preparação das suspensões de esporos, utilizou-se 3 mL de Tween-80 diluído em água destilada a 0,01% estéril para cada placa de Petri contendo *M. anisopliae* esporulado em MCc após 7 dias de incubação a 28 °C. Com auxílio da alça de Drigalsky os conídios foram removidos e suspensos na solução em movimentos delicados de fricção contra a placa. A suspensão foi transferida para um tubo do tipo *Falcon* estéril e centrifugado a 4.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os esporos foram ressuspensos com água destilada estéril. Após, a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se entre 1 a 3 mL de água estéril ao *pellet* de esporos, que foram ressuspensos com auxílio de um *vórtex*. A determinação da concentração de esporos foi feita com o auxílio de câmara de Neubauer. Para experimentos de RT-qPCR, uma alíquota da suspensão foi imediatamente transferida aos meios de

indução/repressão após contagem e o restante mantido sob refrigeração a 4 °C por no máximo 7 dias.

3.7. Cultivo em meio indutor e repressor por fonte de carbono

A partir das suspensões de esporos, 1×10^5 esporos foram inoculados em 50mL de meio mínimo (MM, Sais de Cove) acrescido de 4% de glicose (meio repressor) e meio mínimo acrescido de 4% de trealose (meio indutor) e cultivados por 96 h a 28 °C com agitação a 180 RPM. A cada 12 h, pulsos da fonte de carbono (solução de glicose ou trealose estéril a 2 M) eram adicionados ao meio na concentração de 4%.

3.8. Extração de RNA total de cultivos de *M. anisopliae*

As linhagens foram cultivadas em meio repressor e indutor por 96 h a 28 °C com agitação a 180 RPM (ver item 3.7.). Após o período de cultivo, os micélios foram filtrados e lavados utilizando-se água destilada estéril com auxílio de bomba de vácuo.

O micélio coletado foi macerado utilizando nitrogênio líquido e transferido rapidamente para tubo do tipo *Eppendorf* contendo 1 mL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies). O conteúdo foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio e após nova homogeneização de 15 s foi incubado novamente por 5 min à temperatura ambiente e centrifugado por 15 min a 12.000 g sob refrigeração a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo *eppendorf* e adicionou-se 1 mL de etanol 75%. O tubo foi agitado de forma branda e centrifugado por adicionais 5 min a 12.000 g e à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min até a completa evaporação do etanol. Posteriormente, o *pellet* de RNA foi ressuspenso em 50 µL de água tratada com DEPC, quantificado em NanoDrop 2000/2000C (Thermo) e tratado com DNase livre de RNase utilizando 1 u.µg-1 de RNA total (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80 °C até a sua utilização.

Um experimento de PCR foi realizado para verificar a ausência de DNA genômico utilizando *primers* para amplificar o gene repórter GFP ou yeCherry antes da síntese de cDNA (Quadro 1).

Alíquotas das amostras de RNA total foram submetidas à transcrição reversa utilizando como iniciador oligo dT (Quadro 1) e a transcriptase reversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

3.9. Análise por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

As amostras de cDNA, previamente normalizadas, foram submetidas à RT-qPCR utilizando-se *primers* específicos para os genes GFP, yeCherry e actina como gene referência (Quadro 1). A expressão da linhagem selvagem foi utilizada como referência para mensurar as diferenças de expressão entre os genes repórteres sob regulação dos diferentes comprimentos promotores nas condições propostas, comparadas com a expressão do gene referência (actina).

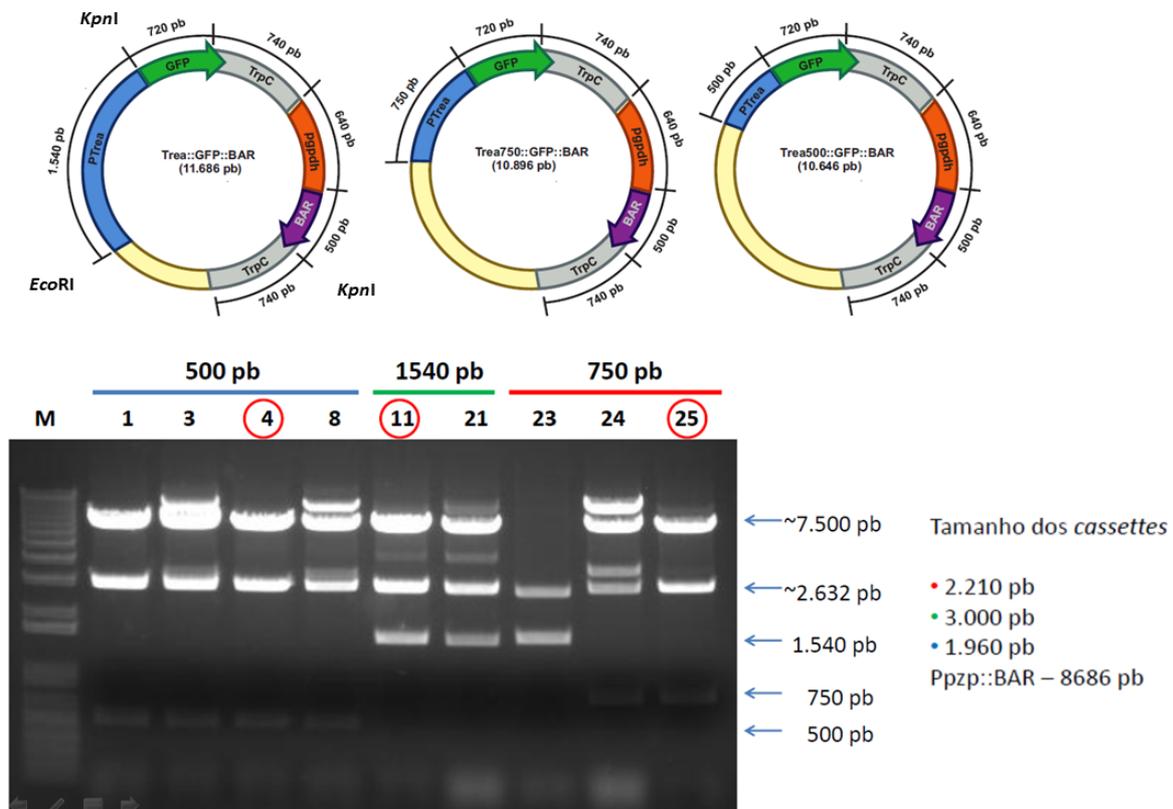
A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando o *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™) e o conjunto *SYBR® Select Master Mix* (Applied Biosystems™) conforme recomendação do fabricante. A análise dos resultados foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e a diferença estatística entre os resultados foi determinada utilizando o teste ANOVA de única via seguido de teste DUNCAN com ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos cassetes

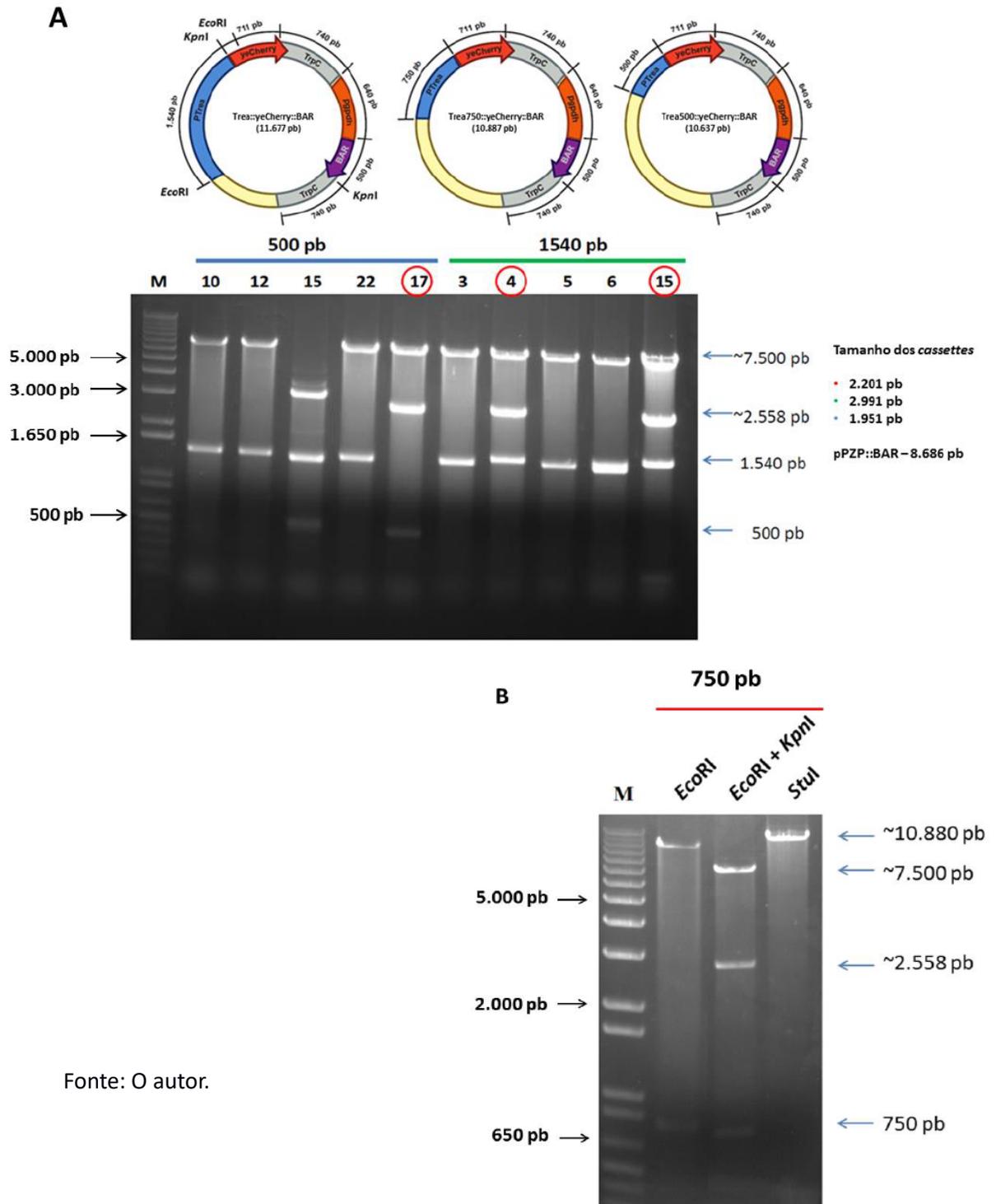
Seis cassetes de expressão foram obtidos neste estudo, sendo três contendo por gene repórter GFP e três contendo yeCherry. Em todas as etapas de clonagem e subclonagens, clivagens de confirmação foram realizadas. Para confirmação da construção final em plasmídio pPZP::BAR contendo a marca de seleção, etapas de clivagem foram realizadas (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Representação esquemática e confirmação das construções GFP::BAR em pPZP. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação TrpC, em verde a região codante da GFP, em roxo o gene marcador que confere resistência a glifosinato de amônio e em laranja o promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo está representado vetor pPZP com 6.806 pb. Sítios para enzimas utilizados na confirmação estão representados no primeiro esquema. Acima está esquematizado as construções dos vetores, abaixo está demonstrada a confirmação por clivagem com o par enzimático *KpnI* e *EcoRI*. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M. Círculos vermelhos mostram amostras positivas com tamanhos de bandas esperadas. Tamanho dos cassetes está representado à direita conforme legenda da figura.



Fonte: O autor

Figura 6. Representação esquemática e confirmação das construções yeCherry::BAR em pPZP. Em azul está representada a região promotora putativa da trealase ácida de *Metarhizium anisopliae* isolada, em cinza a região de terminação TrpC, em vermelho a região codante da yeCherry, em roxo o gene marcador que confere resistência a glifosinato de amônio e em laranja o promotor constitutivo de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. No esquema são demonstrados os comprimentos de cada fragmento. Abaixo da nomenclatura de cada vetor gerado está seu tamanho em pb putativo. Em amarelo, está representado vetor pPZP com 6.806 pb. Sítios para enzimas utilizados na confirmação estão representados no primeiro esquema. A) Acima estão esquematizadas as construções dos vetores e abaixo está demonstrada a confirmação por clivagem com o par enzimático *KpnI* e *EcoRI* para os fragmentos promotores de 1.540 e 500 pb. Círculos vermelhos mostram amostras positivas com tamanhos de bandas esperadas. Tamanho dos cassetes está representado à direita conforme legenda da figura. B) Gel da clivagem de confirmação da construção com o fragmento promotor com 750 pb de comprimento. Marcador de DNA por tamanho em pb (DNA Ladder 1kb Plus) é representado como M.



4.2. Agrotransformação de *M. anisopliae*

Para cada agrotransformação, possíveis transformantes foram isolados e passaram por triagem para confirmar a presença da inserção do cassette de interesse através da metodologia da PCR, utilizando-se os *primers* de amplificação da região codante da GFP ou yeCherry. O número de transformantes isolados inicialmente foi superior a 100 por agrotransformação, contudo, obtemos transformantes positivos já nos primeiros isolados, desta forma, para as agrotransformações seguintes o número de isolados foi 50 por evento (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de isolados por agrotransformação. Conforme representado na Figura 4 foram realizadas seis construções utilizadas em eventos de agrotransformação isolados. A nomenclatura das linhagens foi definida pela presença da letra “G” quando o gene repórter em questão é GFP e pelas letras “yeC” quando o gene repórter é yeCherry. Para distinguir o tamanho promotor que regula a região codante repórter foi definido “Trea” para promotor de 1.540 pb, “Trea750” para fragmento de 750 pb e “Trea500” para fragmento de 500 pb. O plasmídeo ao qual foi inserido o *cassette* de expressão antes do evento de agrotransformação foi pPZP::BAR representado na nomenclatura por “B”. O número de isolados por construção é mostrado no quadro.

Nome da construção	Construção	Nº de isolados
TreaGB	pPZP::BAR::PTrea::GFP	163
Trea750GB	pPZP::BAR::PTrea750::GFP	50
Trea500GB	pPZP::BAR::PTrea500::GFP	50
Trea_yeCB	pPZP::BAR::PTrea::yeCherry	166
Trea750_yeCB	pPZP::BAR::PTrea750::yeCherry	50
Trea500_yeCB	pPZP::BAR::PTrea500::yeCherry	150
Total		629

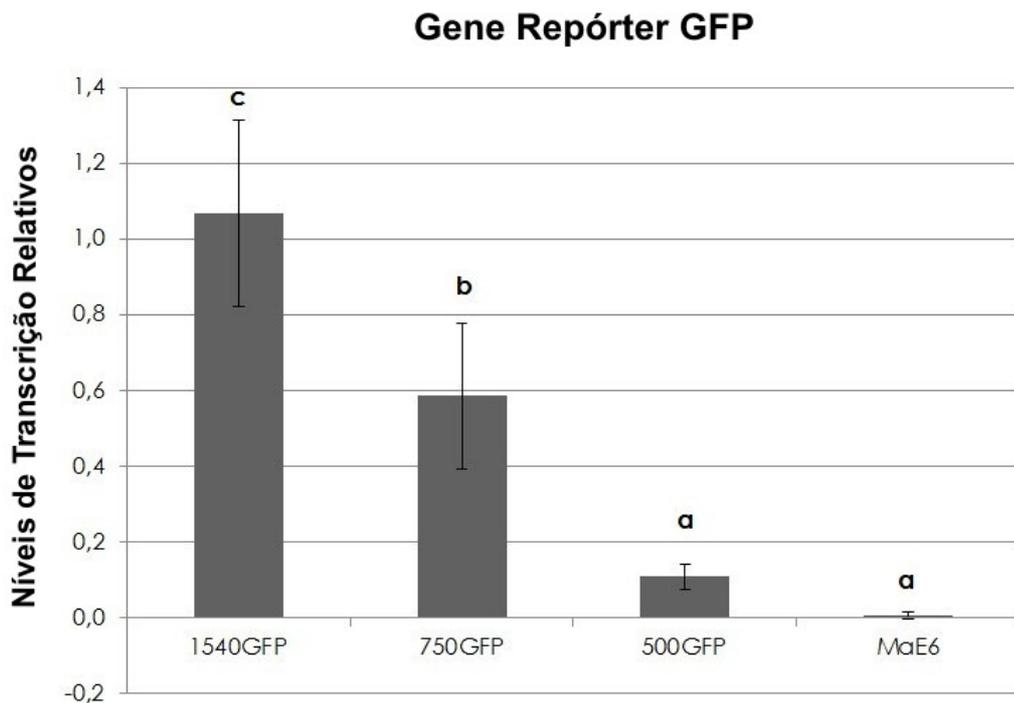
Fonte: O autor

4.3. Análise por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para obter melhores dados quanto à regulação dos genes repórter pelo promotor aqui em análise e seu potencial uso em ferramentas de fácil controle, realizamos ensaios de RT-qPCR. Para isso, cultivamos as linhagens transformadas e selvagem por 5 dias em meio MC indutor com Trealose a 4% e repressor com glicose a 4% (ver item 3.4.). A cada intervalo de 12 horas, novo pulso da solução era adicionado (ver itens 3.1.6. e 3.1.7.). O micélio resultante foi filtrado e o RNA total foi extraído e utilizado como molde para síntese de cDNA. O cDNA obtido foi utilizado na RT-qPCR para amplificação do gene repórter e gene actina como normalizador (Figuras 7 e 8).

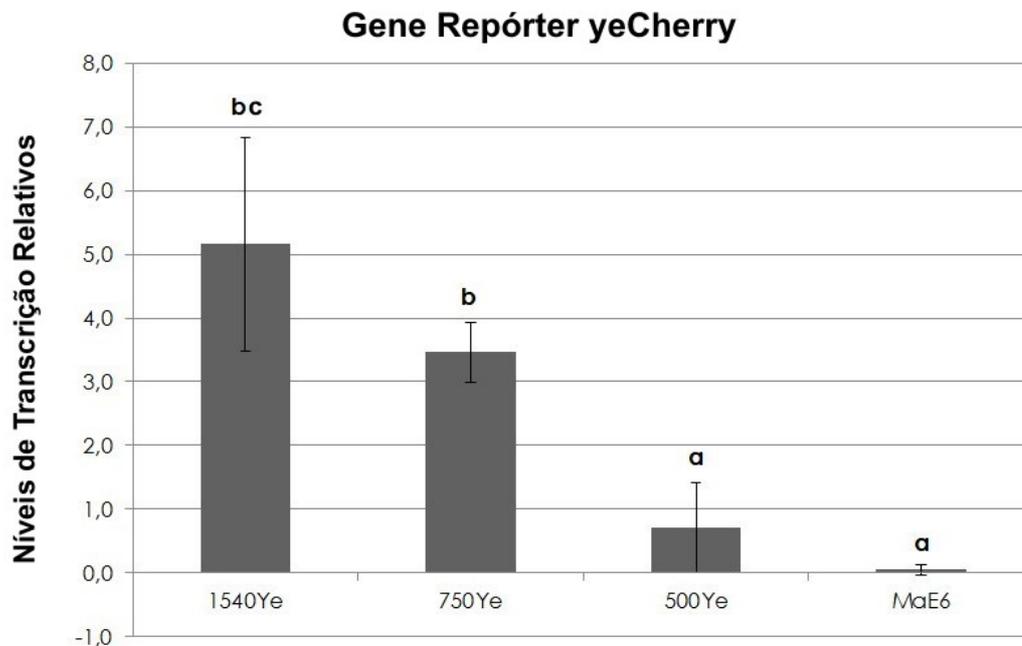
Três fragmentos promotores foram estudados no intuito de observar a região mínima funcional (Figura 3). Os dados demonstram que o maior fragmento promotor isolado (1.540 pb) foi mais responsivo do que as demais construções em meio contendo trealose embora este não obteve níveis de expressão relativos dos genes repórter superiores a 7 vezes em relação aos obtidos em glicose. Por outro lado, o promotor de 500 pb não modulou a expressão dos genes repórter mostrando que, possivelmente, os elementos reguladores contidos a montante desta região são necessários para induzir a expressão do gene (Figuras 7 e 8). Desta forma sugerimos aqui o uso de fragmento promotor de 750 pb ou mais.

Figura 7 – Níveis de expressão relativa do gene repórter GFP sob o controle das construções de diferentes tamanhos do promotor. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para interpretar os resultados. Os valores estão expressos em níveis de expressão relativa. O gene da actina foi utilizado como gene normalizador e representam a média de três experimentos cada. Subconjuntos foram determinados por teste de Duncan, representados por letras e, quando diferentes, indicam diferença estatística. Barras representam o desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$.



Fonte: O autor

Figura 8 - Níveis de expressão relativa do gene repórter yeCherry sob o controle das construções de diferentes tamanhos do promotor. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para interpretar os resultados. Os valores estão expressos em níveis de expressão relativa. O gene da actina foi utilizado como gene normalizador e representam a média de três experimentos cada. Subconjuntos foram determinados por teste de Duncan, representados por letras e, quando diferentes, indicam diferença estatística. Barras representam o desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$.



Fonte: O autor

5. DISCUSSÃO

Em fungos filamentosos sistemas de expressão são amplamente difundidos e utilizados para expressar proteínas, sejam de caráter homólogo ou heterólogo, e avaliar sua função. Em sua maioria, promotores constitutivos e/ou fortes são selecionados para regular o sistema tendo em vista uma maior expressão gênica (HU *et al.*, 2015; JUNG & PARK, 2005; FANG *et al.*, 2009). Ferramentas que possibilitam uma sondagem funcional gênica já foram testadas em *M.anisopliae* e contribuíram para um melhor entendimento metabólico, da fase germinativa, patogênica, crescimento saprofítico, entre outras funções (PADILLA-GUERRERO *et al.*, 2011; NAKAZATO *et al.*, 2006). Tendo em mãos conhecimentos como estes, é possível manipular os genes do patógeno para obter um melhor desempenho do biocontrole (LEGER & WANG, 2010). Em nosso trabalho buscamos elaborar uma ferramenta de expressão sob regulação do promotor homólogo do gene da trealase ácida de *M. anisopliae*.

Liu e colaboradores (2007) relataram a dificuldade em realizar estudos com trealase ácida de *Metarhizium* devido aos baixos níveis de expressão da mesma e, por esse motivo, utilizaram um sistema de expressão constitutivo de *Pichia pastoris*. Contudo, um dos maiores desafios na utilização de promotores constitutivos é que não podem ser seletivamente utilizados para ligar ou desligar a expressão do gene alvo (ZHANG *et al.*, 2016). Assim, promotores constitutivos apresentam a desvantagem de não poderem ser utilizados em estudos cuja expressão do gene pode resultar em produtos citotóxicos, por exemplo (ARRUDA *et al.*, 2016). Similarmente, o *knockout* de genes nem sempre é viável para uma abordagem funcional porque pode ser letal. Níveis altos de expressão obtidos com promotores constitutivos fortes como AOX1 e pTEF1, podem acarretar em uma sobrecarga da maquinaria celular (NAKAZATO *et al.*, 2006; CEREGHINO & CREGG, 2000). Neste caso podem haver problemas de processamento, dobramento e citolocalização do produto. Na busca de contornar tais desvantagens, promotores moderados e reguláveis se tornaram a melhor opção (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Segundo Waring e colaboradores (1989), um bom sistema de expressão deve ter três características-chave: devem existir condições em que a expressão seja desprezível; a indução deve ser rápida e perturbar o crescimento da célula o mínimo possível e os níveis de indução devem ser tão elevados quanto possível. Os promotores reguláveis possuem, assim, a vantagem de regular a transcrição dos genes alvo sob condições específicas, evitando desta forma o crescimento letal ou inibitório (ZHOU *et al.*, 2014).

O promotor em estudo neste trabalho demonstra cumprir os requisitos citados anteriormente demonstrando ser regulado positivamente por trealose mesmo que em níveis brandos em relação à glicose (Figuras 7 e 8) além de favorecer o crescimento da massa celular quando em trealose se comparado ao crescimento em glicose.

Por se tratar de um açúcar simples facilmente metabolizado pelos organismos, a glicose, pode desempenhar um papel fundamental na regulação metabólica celular, bem como, estar envolvida na transcrição de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos. Sendo assim, células que se desenvolvem tendo glicose por fonte primária de carbono reprimem a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas (RONNE, 1995).

Observando-se os elementos de regulação encontrados (Figura 3), o fragmento promotor de menor tamanho tem apenas um local de ligação a CreA e não tem nenhum local CAAT-box. A ausência destes locais de ligação pode explicar níveis de expressão tão desprezíveis como os obtidos ao grupo selvagem sem expressão. Por outro lado, o fragmento promotor de 1.540 pb tem dois sítios de ligação a CreA e obteve os mais elevados níveis de expressão em trealose. Curiosamente o fragmento intermediário, que embora tivesse também o sítio de ligação CAAT-box, tinha apenas um sítio CREA e obteve expressão mais baixa do que o fragmento maior (Figuras 7 e 8).

Quando a expressão relativa de ambos os genes repórter, GFP e yeCherry, foram observadas e comparadas, nota-se uma diferença nos níveis de expressão obtidos (Figuras 7 e 8). Padilla-Guerrero e colaboradores em seu trabalho (2011) também apontam a fluorescência GFP de menor intensidade em relação à mCherry ambas sob regulação do mesmo promotor constitutivo Pma-icl. Sugere-se também que o promotor não é o único fator determinante dos níveis de expressão heteróloga e outros podem interferir, tais como: o tipo de vetor utilizado, a linhagem do organismo, o sítio de integração do cassete no genoma, a composição do meio e propriedades da proteína a ser expressa (LUEKING, 2003). Hong e colaboradores (2006) apontam, ainda, que as condições ótimas da expressão proteica devem ser analisadas caso a caso.

A regulação, no entanto, ocorreu de fato e em meio contendo trealose a expressão é mais elevada se comparado com meio contendo glicose como única fonte de carbono. Até o momento poucos estudos haviam abordado a região promotora da trealase ácida em *M. anisopliae*, muitos dados disponíveis eram baseados em suposições de acordo com respostas da enzima.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho possibilitou uma análise mais aprofundada da região promotora do gene da trealase ácida do organismo modelo *Metarhizium anisopliae* pelo estudo de três diferentes fragmentos desta região, baseados em análises computacionais prévias, no intuito de observar a região mínima funcional.

Dados de RT-qPCR confirmaram a regulação da expressão gênica conferida pela região alvo de estudo deste trabalho. Os níveis de expressão foram de até sete vezes maiores quando em indução por trealose a 4%, sugerindo a utilização de fragmentos do promotor da trealase ácida iguais ou maiores que 750 pb na construção de ferramentas para estudo de função gênica. Embora a regulação tenha sido observada, os níveis de fluorescência detectados foram relativamente baixos para observação em microscopia de epifluorescência (dados não mostrados).

Este trabalho é pioneiro pois consiste no primeiro trabalho demonstrando a regulação do promotor do gene da trealase ácida de *M. anisopliae* utilizando genes repórteres e abre diversas oportunidades de pesquisas posteriores. Além disso, este estudo possibilita a utilização dos vetores construídos como ferramentas no estudo da função gênica de forma regulada.

Até a presente data nenhum vetor de expressão regulável apenas por fonte de carbono foi descrito para *M. anisopliae*. Logo, com esta ferramenta funcional, novas perspectivas de melhoramento genético deste patógeno, bem como, um melhor entendimento do mesmo, poderão ser mais rapidamente executados.

Este trabalho permitiu a elaboração de um manuscrito que está em processo de submissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.M., *et al.* **Biochemical characterization of a Ca²⁺- dependent acid trehalase activity from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*.** FEMS Microbiol.Lett.v.171:p. 11-15, 1999.

AMARAL, F.C. *et al.* **Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases.** Archives Microbiology. v.167. p.202-208. 1997.

AQUINO, A.C. *et al.* **Characterization of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunichemical localisation.** FEMS Microbiology Letters, v. 254, p. 169-175, 2005.

ARRUDA, A, *et al.* **A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter.** Biotechnology Letters. v.38. p.509-517. 2016.

ARRUDA, W., LUBECK, I., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks.** Experimental and Applied Acarology. v. 37. p. 231-244, 2005.

BARRAZA, A. & SÁNCHEZ, F. **Trehalases: A neglected carbon metabolism regulator?** Plant. v.8. p.24778.1-24778.5., 2013.

BENAROUDJ, N. *et al.* **Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals.** Journal of Biological Chemistry. v.276. p.24261-24267. 2001.

BLANFORD, S. *et al.* **Evaluating the lethal and pre-lethal effects of a range of fungi against adult *Anopheles stephensi* mosquitoes.** *Malaria Journal*. v.11. p.365. 2012.

BOLDO, J.T. *et al.* **Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*.** *Current Genetics*. v. 55. p.551-560, 2009.

CAO, Y., JIAO, R., XIA, Y. **A strong promoter, PMagpd, provides a tool for high gene expression in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*.** *Biotechnology Letters*. v. 34. p.557-562, 2012.

CEREGHINO, J.L. & CREGG, J.M. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** *FEMS Microbiology Reviews*. v.24. p.45-66. 2000.

CHENG, Y., *et al.* **Evaluation of Pathogenicity of the Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Hazelnut Weevil (*Curculio nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) Larvae.** *Indian Journal of Microbiology*. v.56. p.405-410. 2016.

CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. **New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects.** *Trends in Microbiology*. v.4. p.197-203, 1996.

COVE, D.J. **The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*.** *Biochim. Biophys. Acta*. v.113. p.51-56. 1996.

CROWE, J.H., CARPENTER, J.F., CROWE, L.M. **The role of vitrification in anhydrobiosis.** Annual Review Physiology. v.60. p.73-103, 1998

DAENFERT, C., FONTAINE, T. **Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose.** Molecular Microbiology. v.24. p.203-216, 1997.

DESTRUELLE, M., HOLZER, H., KLIONSKY, D.J. **Isolation and characterization of novel yeast gene, *ATH1*, which required for vacuolar acid trehalase activity.** Yeast, v.11, p. 1015-1025, 1995.

DIVATE, N.R. *et al.* **Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in ethanol tolerance by accumulation of trehalose.** Bioengineered. v.7. p.445-458. 2016.

DUAN, Z. *et al.* **A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Environmental Microbiology. v.11. p.2351-2360, 2009.

DURMONÉ, K. *et al.* **Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications.** Journal of Microbiology and Biotechnology. v.26. p.1017-7825. 2017.

ELBEIN, A. D. **The metabolism of alpha, alpha-trehalose.** Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. v. 30, p. 227-256, 1974.

ELBEIN, A.D., PAN, Y.T., PASTUSZAK, I., CARROLL, D. **New insights on trehalose: a multifunctional molecule.** Glycobiology vol. 13, p.17-27, 2003.

ERKUT, C. & KURZCHALIA, T.V. **The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance.** *Planta*. v.242. p.389-396. 2015.

FALVO, M.L. *et al.* **UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. but does not affect virulence in fungus-treated *Aedes aegypti* adults and development on dead mosquitoes.** v.121. p.1710-1717. 2016.

FAN, Y. *et al.* **A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, *Bbcsa1*, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** *Microbiology*. v.158. p.1843-1851. 2012.

FANG, W. *et al.* **Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*.** *Journal of Invertebrate Pathology*. v.102. p.155-159. 2009.

FANG, W. *et al.* **Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence.** *Applied and Environmental Microbiology*. v.71. p.363-370. 2005.

FELIX, C.R. **Clonagem de um domínio desestabilizante em *Mycobacterium smegmatis* mc2155 para verificar o funcionamento de um método de regulação induzida de proteínas em micobactérias.** Pelotas, 2010.

FRANCHESCHINI, M. **Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*.** Porto Alegre, 2005. 39

FRAZZON, A.P.G. *et al.* **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*.** Veterinary Parasitology. v.94. p.117-125. 2000.

GARCIA, A.R.M. *et al.* **Screening of fungi for biological control of a triatomine vector of chagas disease: temperature and trypanosome infections as factors.** PLOS Neglected Tropical Diseases. v.10. p.1-14, 2016.

GARÍ, E., PIEDRAFITA, L., ALDEA, M., HERRERO, E. **A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** Yeast. v.13. p.837-848, 1997

GARRE, E. *et al.* **Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** FEMS Yeast Research. v.9. p.52-62, 2008

GOTTI, I.A. **Desenvolvimento de meio de cultura para produção de *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK por fermentação líquida.** São Paulo, 2016.

GRESSEL, J. **Potential failsafe mechanisms against the spread and introgression of transgenic hypervirulent biocontrol fungi.** TRENDS in Biotechnology. v.19. p.149-154. 2001.

HE, M; XIA, Y. **Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings.** FEMS Microbiology Letters. v.29. p.127-135, 2008

HE, S. *et al.* **The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function.** FEBS Journal. v.276. p.5432-5446, 2009.

HONG, I.P., STEPHEN, A., SHIN, G.C. **Evaluation of a new episomal vector based on the GAP promoter for structural genomics in *Pichia pastoris*.** Journal of Microbiology and Biotechnology. v.16. p.1362-1368. 2006.

HU, Y. *et al.* **Efficient production and evaluation of lignocellulolytic enzymes using a constitutive protein expression system in *Penicillium oxalicum*.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. v.42. p.877-887. 2015.

IYER, R. & CAMILLI, A. **Sucrose metabolism contributes to in vivo fitness of *Streptococcus pneumoniae*.** Molecular Microbiology. v.66. p.1-13. 2007.

JORGE, J.A. *et al.* **Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi.** FEMS Microbiology Letters. v.154. p.165-171, 1997.

JULES, M., BELTRAN, G., FRANÇOIS, J., PARROU, J.L. **New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p-Dependent trehalose mobilization.** Applied and Environmental Microbiology. v.74, p.605-614, 2008.

JUNG, Y.J., PARK, H.D. **Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH1) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.** Biotechnology Letters. v.27. p. 1855-1859. 2005.

JUNGES, A. ***Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases**. Porto Alegre, 2010.

KAAYA, G.P., MUNYINYI, D.M. **Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites**. Journal of Invertebrate Pathology. v.66. p.237-241, 1995

KADOWAKI, M.K. *et al.* **Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum***. Biochim. Biophys Acta. v.1291:p.199-205, 1996.

LIEBL, M. *et al.* **Fate and effects of the trehalase inhibitor trehazolin in the migratory locust (*Locusta migratoria*)**. Journal of Insect Physiology. v.56. p.567–574. 2010.

LIU, Y., *et al.* **Expression, purification, and characterization of recombinant *Metarhizium anisopliae* acid trehalase in *Pichia pastoris***. Protein Expression and Purification. v.54. p. 66-72. 2007.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. **Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2-DDCt method**. Methods. v.25. p.402-408. 2001.

LOPES, R.G. **Clonagem, expressão heteróloga e obtenção de mutantes da trealase ácida de *Candida glabrata***. Florianópolis, SC, 2010.

LÚCIO-ETEROVIC, A.K.B.; *et al.* **Biochemical characterisation of the trehalase of thermophilic fungi: An enzyme with mixed properties of neutral and acid trehalase.** *Biochim. et Biophys. Acta.* v. 1723:p. 201-207, 2005.

LUEKING, A., *et al.* **A dual-expression vector allowing expression in *E. coli* and *P. pastoris*, including new modifications.** *Methods in Molecular Biology.* v. 205. p. 31-42. 2003.

LUZ, C. *et al.* **Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* v.93. p.839-846, 1998.

LUZ, C.; RODRIGUES, J.; ROCHA, L.F.N. **Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*.** *Acta Tropical.* v.122. p.29-35. 2012.

MAICAS, S., GUIRAO-ABAD, J.P., ARGÜELLES, J.C. **Yeast trehalases: two enzymes, one catalytic mission.** *Biochimica et Biophysica Acta.* v.1860. p.2249–2254. 2016.

MANIANIA, N.K. *et al.* **Transfer of inoculum of *Metarhizium anisopliae* between adult *Glossina morsitans morsitans* and effects of fungal infection on blood feeding and mating behaviors.** *Journal of Pest Science.* v.86. p.285-292. 2013.

MITSUMASU, K. *et al.* **Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut.** *Insect Mol. Biol.* v.14. p.501–508. 2005.

MAYACK, C. & NAUG, D. **Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers.** Journal of Insect Physiology. v.56. p.1572–1575. 2010.

MULLER, Y.L. *et al.* **Identification of genetic variation that determines human trehalase activity and its association with type 2 diabetes.** Hum. Genet. v.132. p.697-707. 2013.

NAKAZATO, L. *et al.* **Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter.** Applied Microbiology and Biotechnology. v.72. p.521-528, 2006

NWAKA, S., MECHLER, B., DESTRUELLE, M., HOLZER, H. **Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.** FEBS Letters. v.360. p.286-290, 1995.

NWAKA, S., MECHLER, B., HOLZER, H. **Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose.** FEBS Letters. v.386. p.235-238. 1996.

NWAKA, S. & HOLZER, H. **Molecular Biology of trehalose and the trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. v.58. p.197-237. 1998.

ORTIZ-URQUIZA, A., LUO, Z., KEYHANI, N.O. **Improving mycoinsecticides for insect biological control.** Applies Microbiology Biotechnology. v.99. p.1057-1068. 2015.

PADILLA-GUERRERO, I.E. *et al.* **Flexible metabolism in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: role of the glyoxylate cycle during insect pathogenesis.** *Microbiology*. v.157. p.199-208, 2011.

PARROU, J.L., JULES, M., BELTRAN, G., FRANÇOIS, J. **Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function.** *FEMS Yeast Reserch*. v.5. p.503-511, 2005.

PEDREÑO, Y. *et al.* **The *ATC1* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*.** *Journal of Biological Chemistry*. v.279. p.40852-40860. 2004.

PENG, G., *et al.* **Enhancing the utilization of host trehalose by fungal trehalase improves the virulence of fungal insecticide.** *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. v.99. p.8611-8618. 2015.

PENG, L. & XIA, Y. **A expressão da toxina scorpion LqhIT2 aumenta a virulência de *Metarhizium acridum* em relação a *Locusta migratoria manilensis*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v.41. p.1659-1666. 2014.

PERFECT, J.R. *et al.* **Trehalose pathway as an antifungal target.** *Virulence*. v.8. p.143-149. 2016.

PUNT, P.J. *et al.* **Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** *Generate*. v.93. p.101-109. 1990.

ROBERTS, D.W., ST. LEGER, R.J. ***Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects.** Advances in Applied Microbiology. v.54. p.1-70, 2004.

RONNE, H. **Glucose Repression in Fungi.** Trends in Genetics. v.11. p.12-17. 1995.

ROY, A. *et al.* **Acid trehalase deficiency and extracellular trehalose utilization in *Candida utilis*.** World Journal of Microbiology & Biotechnology., v.17, p.737-729, 2001.

SALAS, A.F. *et al.* **Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*.** Medical and Veterinary Entomology. v.31. p.36-43. 2016.

SAN MIGUEL, P.F., ARGÜELLES, J.C. **Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochimica et Biophysica Acta. v.6. p.155-160, 1994

SANCHEZ-FRESNEDA, R. *et al.* **On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase activities.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 383, p. 98-102, 2009.

SCHOLTE, E.J., TAKKEN, W., KNOLS, B.G. **Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Acta Tropica. v.102. p.151-158, 2007.

SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins.** Toxicon. v.56. p.1267-1274. 2010.

SCHWARZ, S. & DIJCK, P.V. **Trehalose metabolism: A sweet spot for *Burkholderia pseudomallei* virulence.** Virulence. v.8. p.5-7. 2016.

SILVA, W.O.B. *et al.* **Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*.** Process Biochemistry. v.44. p.829-834, 2009.

ST LEGER, R. *et al.* **Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., v. 93. p. 6349-6354, 1996.

ST LEGER, R.J. *et al.* **Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants.** FEMS Microbiology Letters. v.131. p.289-294. 1995.

ST. LEGER, R.J. & WANG, C. **Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests.** Applied Microbiology and Biotechnology. v.85. p.901-907. 2010.

ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHANRLEY, A.K. **Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*.** Journal of General Microbiology. v.133. p.1371-1382, 1987.

STAATS, C.C. *et al.*, **Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*.** Applied Microbiology and Biotechnology. v.76. p.945-950. 2007.

TAPIA, H. *et al.* **Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*.** PNAS. v.112. p.6122-6127. 2015.

THEVELEIN, J.M. **Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi.** Experimental Mycology. v.12, p.1-12, 1988.

TOUNOU, A.K. *et al.* **Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions.** Journal of Invertebrate Pathology. v.97. p.203-210, 2008.

VEISOVA, D. *et al.* **Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1.** The Biochemical Journal. v.1;443. p.663-670, 2012 41

WANG, C., ST LEGER, R.J. **The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants.** Eukaryotic Cell, v.6. p.808-816, 2007.

WARING, R.B. *et al.* **Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes.** Generate. v.79. p.119-130. 1989.

WEGENER, G *et al.* **Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle.** *Journal Exp. Biol.* v.213. p.3852–3857. 2010

WESSELS, J.G.H. **Hydrophobins, unique fungal proteins.** *Mycologist.* v.14. p.153-159, 2000.

WYATT, B.R., KALF, G.F. **The chemistry of Insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates.** *The Journal of General Physiology.* v.40. p.833-847. 1957.

WYATT, G.R. **The biochemistry of sugars and polysaccharides in Insects.** *Adv. Insect Physiology.* v.4. p.287–360. 1967

WINKLER, K., *et al.* **Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast.** *Federation of European Biochemical Societies.* v.2. p.269-272. 1991.

XIA, Y. *et al.* **Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** *Journal of Invertebrate Pathology.* v. 80. p.127-132, 2002.

XIA, Y., CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. **Trehalose hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*.** *Journal of Invertebrate Pathology.* v.80. p.139-147, 2002.

ZÄHRINGER, H.; THEVELEIN, J.M.; NWAKA, S. **Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and**

Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Molecular Microbiology*. v.35. p.397-406. 2000.

ZILLI, D.M. *et al.* **Secretion of the acid trehalase encoded by the *CgATH1* gene allows trehalose fermentation by *Candida glabrata*.** *Microbiology Research*. v.179. p.12-19. 2015.

ZHANG, C., XIA, Y. **Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization.** *Current Genetics*. v.55. p.399-407, 2009.

ZHANG, G. **A light-switchable bidirectional expression system in filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** *Journal of Biotechnology*. v.240. p.85-93.2016

ZHAO, H., *et al.* **Identification of an Extracellular Acid Trehalase and Its Gene Involved in Fungal Pathogenesis of *Metarhizium anisopliae*.** *Journal of Biochemistry*. v.140. p.319-327, 2006.

ZHOU, Y.H. *et al.* **Expression and promoter characterization of *BbPacC*, a pH response transcription factor gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** *Microbiology*. v.160. p.353-361. 2014.