



ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 51

Isolamento de Sequência Associada a Telômero de *Metarhizium anisopliae* e Monomorfismo no Locus Subtelomérico de Fungos, Agentes de Controle Biológico

Peter W. Inglis
Luciane Vieira de Mello
Daniel John Rigden
Maria Cléria Valadares-Inglis

Brasília, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte
Membros: Luciano Lourenço Nass
 Regina Maria Dechechi G. Carneiro
 Maurício Machaim Franco
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Maria Alice Bianchi
 Maria Fátima Batista
Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Giscard Matos de Queiroz
Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

© Embrapa 2003



Autores

Peter W. Inglis

Biólogo, PhD em Genética Molecular de Microrganismos, Pesquisador
Visitante, Bolsista do CNPq

Luciane Vieira de Mello

Bióloga, PhD em Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Daniel John Rigden

PhD em Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Maria Cléria Valadares-Inglis

Bióloga, PhD em Genética Molecular de Microrganismos, Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia

Isolamento de Sequência Associada a Telômero de *Metarhizium anisopliae* e Monomorfismo no Locus de Subtelomérico de Fungos, Agentes de Controle Biológico

Peter W. Inglis

Luciane Vieira de Mello

Daniel John Rigden

Maria Cléria Valadares-Inglis

Resumo

A maioria dos fungos filamentosos apresenta polimorfismo nas sequências associadas a telômeros (TAS), permitindo que o mesmo seja utilizado na caracterização genética pelo método de fingerprinting. Entretanto, algumas linhagens de *Metarhizium* sp., *Gliocladium* sp. e *Paecilomyces* sp. não apresentam polimorfismo neste locus, e sim bandas únicas ou poucas bandas. Estas bandas variam em intensidade, quando analisadas por Southern blot, utilizando sonda telomérica. Para investigar este fenômeno, linhagens monospóricas de *Metarhizium anisopliae* (CG34) foram analisadas, mostrando uma ou duas bandas fracas e outra altamente intensa, observadas por análise de fingerprinting com várias enzimas de restrição. As demais linhagens de *M. anisopliae* produziram entre 13 e 16 intensas bandas teloméricas, indicando a presença de 7 a 8 cromossomos neste fungo, o que se relaciona aos dados de cariótipagem por eletroforese de campo pulsado. Os telômeros monomórficos, formando intensas bandas na linhagem CG34 se estendem a aproximadamente 7Kb quando mapeados com a enzima de *ApaI*. Bandas polimórficas maiores que 8kb, entretanto, são produzidas por digestão com *XhoI*, cujo sítio de restrição se situa fora da região de duplicação intercromossomal. Clones de DNA associado a telômeros foram isolados a partir de biblioteca genômica preparada com a enzima *XhoI*, e enriquecida de fragmentos terminais. Os telômeros da CG34 consistem de 18 a 26 repetições do hexanucleotídeo TTAGGG. Internas e adjacentes a estas repetições, em todos os clones, foram encontradas cinco perfeitas repeti-

ções das sequências semelhantes a telômeros, TAAACGCTGG. O clone de 8,1 kb, de população monomórfica, foi identificado por mapeamento de restrição e contém uma larga origem de replicação (ORF) codificando para uma RecQ-like helicase. Esta apresenta homologia nas regiões conservadas com outros genes pertencentes a família das DNA helicases. A presença do gene de helicase, duplicados nas sequências associadas a telômeros, em linhagens de *M. anisopliae*, sugere similaridades aos elementos Y' de levedura, os quais estão envolvidos na sobrevivência de linhagens de levedura, mutantes negativos para telomerase, ou similaridades com os novos elementos transponíveis descritos como *Helitrons*.

Palavras-chave: *Metarhizium*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, RecQ helicase, monomorfismo.

Isolamento de Sequência Associada a Telômero de *Metarhizium anisopliae* e Monomorfismo no Locus de Subtelomérico de Fungos, Agentes de Controle Biológico

Abstract

Most strains of filamentous fungi so far examined display high polymorphism in their telomere associated sequences (TAS), providing a useful fingerprinting method. Some strains of *Metarhizium* sp., *Gliocladium* sp. and *Paecilomyces* sp., however, lack polymorphism at this locus, presenting a single, or few bands of unequal intensity, in Southern blot analysed with telomeric probes. To investigate this phenomenon, we examined a monoconidial strain of *Metarhizium anisopliae* (CG34) producing one or two weak bands and another highly intense band in fingerprinting with various restriction enzymes. Other *M. anisopliae* strains produce around 13 – 16 equally intense telomeric bands, indicating the presence of 7-8 chromosomes in this fungus, which correlates with electrophoretic karyotype data. The monomorphic telomeres forming the intense band in CG34 extend to approximately 7 kb when mapped with the enzyme *ApaI*. Polymorphic bands of greater than 8kb, however, are produced by *XhoI* digestion whose recognition site therefore lies outside the interchromosomally duplicated region. Clones of telomere-associated DNA were isolated from a *XhoI* plasmid library enriched for terminal fragments. The telomeres of CG34 consist of 18 to 26 repeats of the hexanucleotide TTAGGG. Internal and adjacent to these repeats in all clones are five perfect repeats of the telomere-like sequence TAAACGCTGG. An 8.1 kb clone from the monomorphic population, identified by restriction mapping, contains a large open reading frame which is shown to be a RecQ-like helicase sharing homology with the known DNA helicases

families in the conserved regions. The presence of the helicase gene in the duplicated *M. anisopliae* telomere-associated sequences suggests similarity to the Y' elements of yeast, which are involved in strain survival in the absence of telomerase or similarities to the new described *Helitrons* transposable elements.

Key words: *Metarhizium*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, RecQ helicase, monomorphism.

Introdução

Recentemente, fungos filamentosos têm sido desenvolvidos como biopesticidas, devido ao seu potencial de causar doenças em várias espécies de insetos, plantas daninhas e controlar patógenos de plantas. Fungos entomopatogênicos, particularmente *Metarhizium* e *Paecilomyces*, são utilizados no controle de uma variedade de insetos na agricultura (Prior, 1992, Magalhães, 1997, Inglis *et al.*, 2001a), enquanto que outros fungos, a exemplo de espécies de *Gliocladium*, já são usados no controle de uma variedade de doenças de importância agrícola (Wraight *et al.*, 2001). O sucesso no desenvolvimento de produtos comerciais está relacionado à estabilidade genética dos organismos, durante o processo de produção e estocagem. A estabilidade genética destes fungos tem sido analisada, sendo que algumas espécies têm sido relatadas como apresentando declínio na patogenicidade após subcultivo seriado *in vitro* (Fargues & Roberts, 1983). Recentemente, foram relatadas ocorrências de degeneração fenotípica durante a formação de setores em linhagens de *Metarhizium anisopliae*, sendo estas variações relacionadas a mudanças na produção de metabólitos secundários e enzimas (Ryan *et al.*, 2002). Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos genéticos relacionados à variação fenotípica nestes organismos.

Estudos prévios de variabilidade genética do grupo de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*) por RFLP, utilizando sonda telomérica (Inglis *et al.*, 1999), mostraram grande polimorfismo no locus subtelomérico. Utilizando esta técnica, identificamos linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, isolado CG34; *Paecilomyces* sp. e *Gliocladium* sp., produzindo duas bandas teloméricas relativamente fracas e uma terceira banda intensa. A maioria das linhagens de *Metarhizium* produz de 13 a 16 bandas teloméricas de igual intensidade, indicando a presença de 7 a 8 cromossomos neste fungo, o que é confirmado por cariótipo eletroforético (Valadares-Inglis & Peberdy, 1998). Este fenômeno de monomorfismo associado a sequências de DNA telomérico foi anteriormente observado em linhagens de *Botrytis cinerea*, onde a maioria das linhagens apresenta polimorfismo no DNA associado a telômeros (Levis *et al.*, 1997b).

A ausência de polimorfismo no locus associado a telômeros poderia ser explicada por eventos de recombinação endógena múltipla entre terminais cromossômicos nestas linhagens ou por atividade de elementos transponíveis

com sítios de integração preferenciais na região telomérica. Transposon degenerado LTR, denominado *Pogo*, foi identificado na região telomérica VR de *Neurospora crassa* (Schechtman, 1987). Entretanto, outras prováveis cópias deste elemento, identificadas por hibridização, foram encontradas em outros sítios não teloméricos. Em mosca das frutas, *Drosophila melanogaster*, os telômeros são mantidos por transposição e duplicação em “tandem” de retrotransposons do tipo non-LTR (não-longos terminais repetitivos); incluindo os transposons LINE-like e HeT-A, associados aos terminais cromossômicos quebrados (Danilevskaya *et al.*, 1994), e TART (telomere-associated retrotransposon) que se transpõe e duplica naturalmente nos terminais cromossômicos (Levis *et al.*, 1993). Outros retrotransposons non-LTR, como TRAS1 (Takahashi & Fugiwara, 1999) e SART1 (Takahashi *et al.*, 1997) contêm ORFs (“open reading frames”) codificando para gag- e pol-like, além da 3’ poly (A) inseridas em sítios específicos, em regiões de repetições teloméricas de bicho da seda, *Bombyx mori*.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, um mosaico de repetições diferentes, variando de terminal para terminal, entre linhagens, está presente em sequências associadas a telômeros e podem ou não conter ORFs. A sequência mais comum associada a telômero (TAS) em *S. cerevisiae* é o elemento Y’, altamente conservado e com função e origem desconhecidas (ver revisão de Louis, 1995). Entretanto, ampliações dos elementos Y’ associados a telômeros são parte dos mecanismos alternativos de alongamento de telômeros (ALT) envolvidos na manutenção da sobrevivência de mutantes telomerase negativos (Yamada *et al.*, 1998; Louis, 1995).

Devido às potenciais implicações dos rearranjos das sequências de DNA associadas a telômeros na estabilidade genômica de fungos filamentosos utilizados no controle biológico, a região de monomorfismo de DNA associado a telômeros da linhagem CG34 de *M. anisopliae* foi clonada e caracterizada. Este trabalho pode auxiliar no entendimento dos mecanismos pelos quais estes DNAs associados aos telômeros são duplicados ou transferidos entre cromossomos deste isolado.

Materiais e Métodos

Linhagens: Nove linhagens de *Paecilomyces* sp., 14 linhagens de *Metarhizium* sp. e 18 de *Gliocladium* sp. foram utilizadas para análise de polimorfismo. As linhagens de *Metarhizium* e *Paecilomyces* foram obtidas da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e as linhagens de *Gliocladium* procedentes da Embrapa Uva e Vinho (gentilmente cedidos pela Dra. R.M. Sanhueza). Os isolados foram armazenados em nitrogênio líquido e os cultivos foram feitos em BDA (batata dextrose ágar – Difco). A linhagem CG34 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, utilizada para clonagem do TAS (sequência associada a telômero), foi originalmente isolada de *Conotrachelus* sp. (Coleoptera:Curculionidae) em Manus, Amazonas, Brasil, em 1988.

Extração e manipulação de ácidos nucléicos: O DNA genômico do fungo foi extraído de micélio crescido por 48h a 28°C em 200ml de meio completo para *Aspergillus* (Pontecorvo *et al.*, 1953), com 280rpm de rotação, utilizando-se o método CTAB (Rogers and Bendich, 1988). Southern blots foram preparados utilizando-se membranas de nylon (Zeta probe, Bio-Rad) de acordo com os métodos convencionais. Sondas foram marcadas com a³²P-dCTP, com o kit Rediprime (Amersham Pharmacia Biotech) e utilizadas para hibridização, e os blots foram expostos a filmes de raios-X.

RFLP e mapeamento de restrição das sequências de DNA associadas a telômeros na linhagem CG34: Os DNAs genômicos (5µg) de cada isolado foram digeridos com enzimas de restrição (*EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) em tampão apropriado. Após eletroforese, os fragmentos de DNA foram transferidos para as membranas de nylon para hibridização. Para o mapeamento das sequências associadas a telômero, causando monomorfismo, o DNA genômico da linhagem CG34 foi digerido com diversas enzimas de restrição. Sonda de DNA foi preparada por digestão do plasmídeo pMSC1 (gentilmente cedido pelo Dr. D. TeBeest), contendo sequência de consenso telomérico isolada de *Fusarium oxysporum* [TTAGGG]₁₈ (Powell & Kistler, 1990), com as enzimas *SstI/XbaI*.

Preparo e seleção de biblioteca genômica enriquecida de sequências terminais, da linhagem CG34 de *Metarhizium anisopliae*:

O reparo dos terminais teloméricos foi conduzido utilizando-se uma modificação do método de Bhattacharyya & Blackburn (1997). O DNA genômico da linhagem CG34 (10mg) foi tratado com cinco unidades da enzima Vent^o DNA polimerase (NEB) em tampão recomendado pelo fabricante, contendo 1mM de dNTP's, a 70°C por 1 h. Após precipitação com etanol, este DNA com extremidades abruptas foi ligado ao plasmídeo pBluescript I sk⁺ (1µg; Stratagene) digerido com a enzima *EcoRV*. Os produtos de ligação foram digeridos com *XhoI* e religados. Este DNA foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* XL10 Gold (Stratagene) preparadas segundo o método de Inoue *et al.* (1990). Células transformadas foram plaqueadas em meio LB suplementado com ampicilina, IPTG e X-gal e mantidas a 28°C por 36h. As placas foram incubadas à baixa temperatura para permitir o completo restabelecimento dos clones contendo repetições teloméricas de *M. anisopliae*, presumivelmente devido à instabilidade das sequências repetitivas em *E. coli*. a 37°C. Colônias foram transferidas e o DNA fixado em membrana Genescreen plus (Du Pont) de acordo com os procedimentos padrões. A sonda, representando telômeros e DNA associado a telômero da linhagem CG34, foi preparada. Um micrograma de DNA genômico não reparado, da linhagem CG34, foi digerido com *XbaI*, anteriormente apresentando intensa banda de hibridização com aproximadamente 500bp, e ligado ao plasmídeo pBluescript II sk⁺ digerido com *XbaI*. O nucleotídeo [CCTAAA]₄ e o primer de 23 mer correspondendo ao promotor T3 de pBluescript foram utilizados para amplificar os telômeros e as sequências associadas a telômeros, a partir da mistura de ligação dos produtos de *XbaI*, por PCR, incorporando-se ³²P-dCTP. O produto de PCR foi utilizado como sonda de seleção da biblioteca *XhoI* enriquecida com terminais teloméricos. Colônias que apresentaram sinais positivos de hibridização foram analisadas por digestão com enzimas de restrição. O clone denominado pMAT3A1, contendo sítios de restrição semelhantes aos resultados de Southern blot, foi selecionado para estudos posteriores. Os terminais inseridos de outros cinco terminais cromossômicos foram clonados e parcialmente sequenciados, utilizando-se o primer M13 Reverse, para determinação da estrutura telomérica.

Análise da sequência do clone telomérico pMAT3A1:

Um conjunto de deleções para ambas as fitas do clone pMAT3A1 foi preparado utilizando-se a técnica de digestão com exonuclease III (Henikoff, 1987). Os clones foram sequenciados pelo método de terminação em cadeia, usando-se o

kit Termo-Sequenasase radiolabeled terminator cycle sequence (Amersham Pharmacia Biotech) e dNTP's marcados com $\alpha^{32}\text{P}$. Análise inicial do clone pMAT3A1 revelou a presença de uma larga ORF (open reading frame), cuja sequência protéica deduzida foi submetida a estudos de homologia estrutural.

Análise da proteína deduzida a partir da sequência clonada:

Estudos iniciais da sequência foram conduzidos utilizando-se FAST3 (Pearson & Lipman, 1988) na base de dados Swissprot. Análises mais sensíveis, com o objetivo de identificação de homólogos foram conduzidas utilizando-se PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), modelo de Maekov (Karplus *et al.* 1998) e o método FFAS (Rychlewski *et al.*, 2000). A homologia estrutural foi analisada utilizando-se os métodos GenTHREADER (Jones, 1999a), 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 1999). Estrutura secundária foi estimada utilizando diferentes métodos (Karplus *et al.*, 1998 e Jones, 1999b). Alinhamentos iniciais foram feitos utilizando-se o método de Jalview modificado (disponível na <http://circinus.ebi.ac.uk.6543/jalview>). Anotações dos alinhamentos foram feitas utilizando-se Alscript (Barton, 1993).

Resultados e Discussão

Monomorfismo no loci subtelomérico em linhagens de Gliocladium sp., Paecilomyces sp. e Metarhizium sp.

Repetições teloméricas foram utilizadas no fingerprinting de fungos filamentosos como *Metarhizium* sp. (Inglis *et al.*, 1999), *Cercospora caricis* (Inglis *et al.*, 2001b), *Nomuraea rileyi* (Boucias *et al.*, 2000) e *Beauveria* sp. (Viaud *et al.*, 1998). Análise de *Metarhizium*, *Paecilomyces* e *Gliocladium* sp. utilizando repetições teloméricas [TTAGGG]₁₈ revelaram monomorfismo de bandas em algumas linhagens (Fig. 1), em oposição a múltiplas bandas esperadas e observadas em outras linhagens. Dentre as 09 linhagens de *Paecilomyces* analisadas, somente uma apresentou bandas monomórficas em análise de Southern Blot com DNA digerido com *Pst*I (Fig. 1), *Hind*III e *Eco*RV (dados não apresentados). Entretanto, observou-se monomorfismo em 21% das linhagens de *Gliocladium* sp., onde as linhagens 10GDO2 e GSJ1 apresentaram bandas monomórficas quando digeridas com *Pst*I, enquanto que outras apresentaram polimorfismo com esta enzima. Diversas linhagens de *M. anisopliae* mostraram falta de

polimorfismo no loci telomérico, quando o DNA genômico foi digerido com *EcoRI*, como previamente observado para a linhagem CG34.

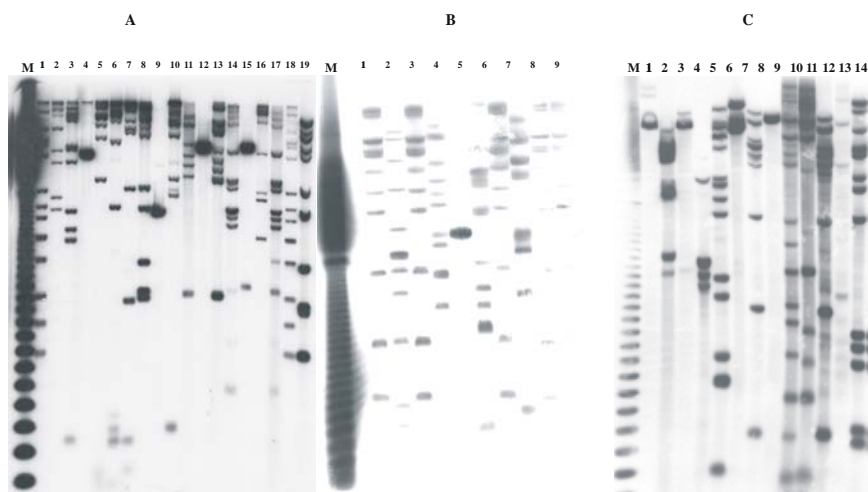


Fig.1. Southern blot de DNA genômico de linhagens de: (A) *Gliocladium* sp. digerido com *PstI*, (B) *Paecilomyces* sp. digerido com *PstI* e (C) *Metarhizium anisopliae* digerido com *EcoRI*, hibridizados com sonda de sequência telomérica [TTAGGG]₁₈. Em (A) as linhas 4, 9 12 e 15; (B) linha 5 e (C) linhas 1, 3 e 9; correspondem as linhagens apresentando monomorfismo na região telomérica. As linhas marcadas com M correspondem a marcador 100pb.

Linhagens mais afetadas apresentaram poucas bandas fracas juntamente com outra banda telomérica altamente intensa, indicando que o evento responsável pela aparente falta de polimorfismo nestas linhagens não envolve terminal cromossômico. Entretanto, a linhagem CG292 de *Metarhizium* sp., linhagem CG323 de *Paecilomyces* sp. e linhagens 3GDO1, 10GDO2, GSJ1 e GFO3 de *Gliocladium* sp. apresentam banda telomérica única e intensa, sugerindo que todos os terminais cromossômicos foram alterados de maneira similar. A falta de polimorfismo nas sequências associadas a telômeros não é um evento incomum e parece afetar outras espécies, uma vez que bandas monomórficas foram observadas em linhagens de *Trichoderma* (dados não apresentados). Nenhuma correlação foi observada em relação a variações de hospedeiros e regiões

geográficas, sugerindo que este evento ocorre amplamente em fungos filamentosos de forma casual, sendo que os mecanismos genéticos envolvidos são desconhecidos.

Em *M. anisopliae*, linhagens possuindo polimorfismo nas sequências associadas aos telômeros apresentaram número variável de bandas, observando-se na linhagem CG322 um total de 18 bandas, o que corresponde a 9 cromossomos. Cariotipagem eletroforética mostra que algumas linhagens brasileiras de *M. anisopliae* apresentam 7 cromossomos, enquanto outras apresentam oito cromossomos (Valadares-Inglis & Peberdy, 1998). Shimizu *et al.* (1992) mostrou a presença de sete cromossomos em isolados japoneses de *M. anisopliae*, sugerindo que a ocorrência de rearranjos ou duplicações de DNA associados a telômero seja responsável pela ausência de polimorfismo em algumas linhagens, e não pela perda ou fusão de cromossomos inteiros. Esta correlação numérica entre bandas detectadas com sonda telomérica e número de cromossomos demonstra que não existem repetições teloméricas em loci cromossômico não terminal nestas linhagens.

DNA associado a telômeros na linhagem CG34 foi mapeado em detalhes utilizando-se várias enzimas de restrição (dados não apresentados). A maioria das enzimas testadas produziu padrão similar ao observado para a *EcoRI*, ou seja, banda telomérica intensa, única ou associada a uma ou duas outras bandas fracas. Entretanto, *NotI*, *SmaI*, *SpeI* e *XhoI* produziram polimorfismo consistindo em fragmentos de alto peso molecular, indicando a presença de sítios de restrição fora da região duplicada. Outras enzimas testadas produziram multiplicidade de bandas variando de 450bp para *SacI* a aproximadamente 7000bp para *ApaI*. As enzimas *SacI* e *XbaI* também produziram 5 e 4 bandas fracas respectivamente, em adição a uma banda intensa de hibridização, sugerindo que certas cópias do elemento duplicado contém polimorfismo.

Clonagem de sequência duplicada, associada a telômero, da linhagem CG34 do fungo *M. anisopliae*:

A enzima *XhoI* foi utilizada para clonagem, devido ao fato de a mesma produzir bandas polimórficas com peso molecular maior que 8.0kb. A biblioteca genômica foi produzida em pBluescript II sk + e transformada em *E. coli*. Seis clones foram identificados como contendo terminais cromossômicos, sendo utilizados para

análise e mapeamento. O clone denominado pMAT3A1, contendo um inserto de aproximadamente 8,0kb foi selecionado para análises complementares.

Análise da sequência do clone pMAT3A1

Os telômeros ligados ao sítios de *EcoRV* dos quatro clones, incluindo pMAT3A1, mostraram a presença de números variáveis de hexanucleotídeos TTAGGG repetidos em "tandem". Estas repetições teloméricas são idênticas às repetições de telômeros humanos (Meyne *et al.*, 1989), de *Physarium* (Forney *et al.*, 1987), de *Trypanosoma* (Blackburn & Challoner, 1984) e de fungos filamentosos como *Neurospora crassa* (Schechtman, 1987), *Ustilago maydis* (Gúzman & Sanchez, 1994) e *Aspergillus nidulans* (Bhattacharyya & Blackburn, 1997), dentre outros. Em dois clones contendo insertos hibridizados em Southern blot, nenhuma sequência telomérica foi encontrada, sugerindo que estes tenham sido originados por reparo do DNA telomérico proximal ou que as repetições teloméricas tenham sido perdidas por recombinação em *E. coli*. A perda por recombinação é mais provável, uma vez que nenhum clone contendo telômero foi observado em clones incubados a 37 °C, mostrando que clones contendo sequências repetitivas são altamente instáveis em linhagens de *E. coli*, sendo possível clonagens somente em baixas temperaturas (Hanahan *et al.*, 1991). Clones contendo sequências teloméricas apresentaram 20 repetições TTAGGG (pMAT1B1), 18 repetições (pMAT3A1), 23 repetições (pMAT7C1) e 26 repetições (pMAT10A4), sugerindo que o tamanho dos telômeros seria aproximadamente entre 108 a 156pb. A razão desta variação poderia ser devido à fidelidade da atividade da exonuclease x-5, da enzima Vent DNA polimerase utilizada para reparar o terminal telomérico do DNA. Entretanto, em presença de excesso de dNTP's, a perda de DNA telomérico seria mínima (Zakian, 1989). Além disso, os telômeros são conhecidos pela sua heterogeneidade em tamanho de DNA, mesmo para um único cromossomo (Zakian, 1989). O tamanho dos telômeros da linhagem CG34 é similar ao observado para o fungo *A. nidulans* (~ 100pb; Bhattacharyya & Blackburn, 1997) e os telômeros VR de *N. crassa* (162pb; Schechtman, 1987).

Em todos os clones, incluindo o pMAT1B1, foram encontradas 5 sequências de repetição perfeitas, TAAACGCTGG, imediatamente adjacente a repetição TTAGGG. Esta sequência semelhante a telômero parece ser única para a espécie de *M. anisopliae*, não sendo encontrada em outros fungos filamentosos ou outras sequências disponíveis. Nenhuma sequência do tipo LTR (long terminal

repeats) foi identificada em pMAT3A1, bem como nenhum sítio de duplicação, o que poderia sugerir sítios característicos de inserção de retrotransposons.

Uma larga ORF (open reading frame) de 54.00pb foi identificada na região centromérica proximal do clone pMAT3A1. A análise da sequência mostrou homologia com genes codificando para uma RecQ helicases (Tab.1).

Tabela 1. Homologia da RecQ helicase de *Metarhizium anisopliae* com quinze outras RecQ helicases, utilizando-se BLAST.

Nº	valor e	scoreZ	Tamanho	Nome	Organismo
1	1e ⁻⁴⁴	184	823	telomere-linked helicase 1	<i>Magnaphorte grisea</i>
2	5e ⁻⁴¹	172	752	telomere-associated RecQ-like helicase	<i>Ustilago maydis</i>
3	5e ⁻³³	152	1887	DNA helicase possibly pseudo	<i>Schizosaccharomyces</i>
4	6e ⁻²⁸	128	1447	DNA helicase TPS1 – yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	8e ⁻²⁷	125	610	ATP-dependent DNA helicase	<i>Yersinia pestis</i>
6	2e ⁻²⁶	124	731	hypothetical protein	<i>Trichodesmium erythraeum</i>
7	4e ⁻²⁶	122	705	DNA helicase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
8	5e ⁻²⁶	122	1142	Gd BLM	<i>Gallus gallus</i>
9	6e ⁻²⁶	122	605	hypothetical protein	<i>Magnetococcus</i> sp.
10	6e ⁻²⁶	122	631	DNA helicase RecQ	<i>Leptospira interrogans</i>
11	6e ⁻²⁶	122	766	ATP-dependent DNA helicase	<i>Encephalitozoon</i>
12	3e ⁻²⁵	119	410	DNA helicase	<i>Homo sapiens</i>
13	3e ⁻²⁵	119	1231	hypothetical protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>
14	5e ⁻²⁵	119	1189	Sgs1p	<i>Candida albicans</i>
15	8e ⁻²⁵	118	615	ATP-dependent DNA helicase	<i>Salmonella typhimurium</i>

Análise da sequência da ORF (open reading frame)

Utilizando-se FASTA3, observou-se clara similaridade da ORF com outras sequências da base de dados SWISSPROT. A relação mais próxima foi obtida com duas sequências associadas a telômeros, codificando para uma RecQ-like helicase do fungos *Magnaphorte grisea* e *Ustilago maydis*, Swissprot O13399 e O13400, (Sanchez-Alonso & Guzman, 1998). Seguiram-se outras helicases, sendo que as sequências apresentam identidades de resíduos em torno de 26%, em aproximadamente 480 resíduos. Estes resultados permitem sugerir que a ORF seria membro da família das DEAD/DexH helicases (ver revisão de de la Cruz *et al.*, 1999), com homologia nas regiões de consenso de helicases. As regiões do P-loop e DexH (motifs I e II) estão envolvidos na ligação de substrato de ATP, enquanto que o TGTLP (motif III) forma uma ligação flexível entre os

primeiros dois domínios da estrutura da helicase. No domínio VI, os dois resíduos de Arg ligam ao ATP e são conservados (Fig.2). Uma grande homologia foi observada na estrutura secundária prevista, com estruturas do cristal da helicase de *U. maydis*.

Conclusões

A sequência duplicada na região telomérica de *M. anisopliae*, codificando para uma RecQ-like helicase, apresenta similaridades com os elementos Y' de leveduras, os quais estão envolvidos na manutenção da viabilidade celular em ausência de telomerase. Esta sequência está duplicada ao terminal de todos os cromossomos, em cópias únicas por telômeros, como indicados pelos dados de hibridização de Southern blots. A consequência das duplicações, bem como os mecanismos de indução, ou o envolvimento do gene RecQ-like helicase neste processo, são desconhecidas.

O significado das duplicações dos TAS da linhagem CG34 não é claro, no entanto paralelos com os elementos Y' podem ser feitos, devido ao fato de os elementos Y' possuírem um gene de helicase, o qual poderia ser suficiente para permitir a duplicação deste elemento. Entretanto, o mecanismo de transposição dos elementos Y' não são conhecidos, sendo possível que produtos de outros genes sejam necessários para sua duplicação, como por exemplo a atividade da helicase.

Recentemente, uma classe diferente de elementos transponíveis, denominada *Helitrons*, foi descrita em *Arabidopsis*, arroz, *Caenorhabditis elegans*, milho (Freshotte & Wessler, 2001; Kapitonov & Jurka, 2001; Lal *et al.*, 2003). *Helitrons* são grandes sequências de replicação autônoma, de 5 a 15kb, não apresentam terminais repetitivos e contêm domínios DEAD de helicase. De acordo com Lal *et al.*, (2003), os *Helitrons*, como outros elementos transponíveis, podem ser ferramentas importantes para a expansão do genoma, frequentemente capturam genes importantes e os multiplicam durante sua jornada através do genoma. Mecanismos semelhantes podem, provavelmente, estar envolvidos no monomorfismo observado no loci telomérico, onde o gene de helicase foi observado em fungos filamentosos, principalmente no *M. anisopliae*. Outros estudos são necessários para o melhor entendimento da função deste gene, bem como os efeitos do monomorfismo nos terminais teloméricos de fungos.

	I	Ia	
MusN from <i>A. nidulans</i>	KDTFV LMP-TGGGKSLCYQLPSVSSGSTRGVTLVVISPLLSLMQDQVSHL		764
QDE from <i>N. crassa</i>	KDAFV LMP-TGGGKSLCYQLPAVVVRSKTRGITVVISPLLSMLDQVNH		969
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	KDFV LMP-TGGGKSLCYQLPAVVVRSKTRGITVVISPLLSLMQDQVSHL		742
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	NDCFV LMP-TGGGKSLCYQLPAALTEG---VTIVISPLKSLIFDQINKL		797
BLM from <i>H. sapiens</i>	EDCFI LMP-TGGGKSLCYQLPACVSPG---VTVVISPLRSLIVDQVKL		727
TLH1 from <i>M. grisea</i>	LPFVQ ITCTGGCKSLSFILPAFCTGITG---TTIVVVPLVALREDLWRC		287
WRN from <i>H. sapiens</i>	RDNVV AMATCYCKSLCFQYPPVVGK---IGLVISPLLSIMEDQLQL		609
RecQ from <i>Metarhizium</i>	QSPVV AVLPTGGCKSLVFMVPAFLSGS---GVTVVVAPFAKLTQLVQR		1003
	: * * * * * : * .	: * * : * .	
MusN from <i>A. nidulans</i>	RQNKIKAYLINGDTPSEERQWIMSTLSSHNPETHIELLYITPEMISKSHA		814
QDE from <i>N. crassa</i>	ANLMIQAYAFNGDMNSEEMRRMVFQKIDAEHPEHELQLLYVTPEMVKNGT		1019
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	LNKNIKAMFSSRGTAEQRRTQTFNLFINGL---LDLVIISPEMISASEQ		788
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	ASLDICAKLSGEQKADVMAIYRDLESQP---PMVKLLYVTPPEKISSAR		845
BLM from <i>H. sapiens</i>	TSLDIPATYLTGDKTDSRATNIYLQLSKDD---PIIKLLYVTPPEKISSAR		775
TLH1 from <i>M. grisea</i>	RESSIEAHVWTSRGMNR-----AAAIIVFVTPESAS-TKM		320
WRN from <i>H. sapiens</i>	KMSNIPACFLGSAQSENVLTDIKLG-----KYRIVVYVTPPEYCSGNMG		651
RecQ from <i>Metarhizium</i>	IDAGLDCKMWEPEARESWPR-----VTIIVAAETASSD		1035
	:	:	
	II		
MusN from <i>A. nidulans</i>	LTDRIEKLCISIQKLARVVIDEAHCVSQWGHDFRFDYKQIGAFRARIPIGVP		864
QDE from <i>N. crassa</i>	FVNKMDLYRRKKLARIVIDEAHCVSQWGHDFRFDYKAIGEFRKRFPFVGP		1069
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	CKRAISRLYADGKLARIVVDEAHCVSQWGHDFRFDYKELKFFKREYDIP		838
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	FQDTLDTLNSNNYISRFVIDEAHCVSQWGHDFRFDYKGLVKRFPNVP		895
BLM from <i>H. sapiens</i>	LITLENLIERKLLARFVIDEAHCVSQWGHDFRQDYKRMNMLRQKFPSPV		825
TLH1 from <i>M. grisea</i>	FRDFVNRRLVRQELDRVVVDECHMVLADGSEFRFQGLLGRITAGWG-VQ		369
WRN from <i>H. sapiens</i>	LLQQLEADIG---ITLIVVDEAHCISEWGHDFRDSFRKLSLKTALPMVP		698
RecQ from <i>Metarhizium</i>	FLRWAADLSVRGRILDRIVVDECHLTPAADAERYNKLRALAQLR--NLGCP		1083
	:	:	
	III		
MusN from <i>A. nidulans</i>	LMALTATATENVKVDVIHNLRMQG--CEVFTQSFNRPNLTYEVRRKG--K		910
QDE from <i>N. crassa</i>	VMALTATATQNVILDVKHNLAMED--CQTFQSFNRPNLTYEVRRK---K		1113
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	MIALTATASEQVVRMDI IHNLKE--PVFLKQSFNRPNLTYEVRRK---K		882
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	TIALTATATFRVRDLILAQLNLKN--CKWFLSSEFNRPNLTYEVRRK---K		940
BLM from <i>H. sapiens</i>	VMALTATANFRVQKIDLLTQLKILR--PQVFSMSFNRPNLTYEVRRK---K		870
TLH1 from <i>M. grisea</i>	VVCLTATLSPRDEAFHQAMGFQGNMVTIYRVLTSRHNIEYRVRYTK--K		417
WRN from <i>H. sapiens</i>	IVALTATASSIREDIVRCLNLRN--PQITCTGDFDRPNLYEVRRKTNKI		746
RecQ from <i>Metarhizium</i>	FVFLTGTPLPRLQREFEEMLLQN--PLYTRASSHRVNRVAVRRVKTGQ		1131
	: * * * .	: * * .	
	IV		
MusN from <i>A. nidulans</i>	HAELLDIADTIKSTYRNKCGIVVCLSRNTCEKVAEALRTNYS---IKAE		957
QDE from <i>N. crassa</i>	EQNLARI AE L I KEKYDGGTGIIYVLSRKS AEN I AKNLQEKHR---IKAK		1160
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	TKNTIFEICDAVKSFRPKNGTGIIYVLSRKSCEQTS AQMQRNG---IKCA		928
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	GVSTLDDISRYIRSKPQHFSGIIYVLSRKECDETSKMKCKDG---VRAV		986
BLM from <i>H. sapiens</i>	PKKVAFDCL E W I R K H H P Y D S G I I Y V L S R R E C D T M A D T L Q R D G ---L A A L		916
TLH1 from <i>M. grisea</i>	VGGKQQAIEEAVEEAVG--EARLRYGDDTRMIVYRGTIKRTETIGESLGC		466
WRN from <i>H. sapiens</i>	LQDLQPFVKTSSHWEFEGPTIIVYPSRKMVTQVTEGELRKLN---LSCG		792
RecQ from <i>Metarhizium</i>	GIMEVKRLVEAWQGGNDNGNKPVPVKKGVYVCLSHAKRALAR-QLGCH		1180
	:	:	
	V		
MusN from <i>A. nidulans</i>	YHAGLDAET-----RARTQQRWQAG-DVHVIVATIAFGMGIDKDPVRF		1000
QDE from <i>N. crassa</i>	YHASITDE-----KISVQHENQGT-RVKVIVATIAFGMGIDKDPVRF		1203
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	YHAGMEPE-----RLSVQKAWQAD-EIQVICATVAFGMGIDKDPVRF		971
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	SYHAGLTD-----RESRQKDWLTG-KMRVICATVAFGMGIDKDPVRF		1029
BLM from <i>H. sapiens</i>	AYHAGLSDSA-----RDEVOKKNINQDCCQVICATIAFGMGIDKDPVRF		960
TLH1 from <i>M. grisea</i>	IYHAGVADENG-----KKIIMQAMRE--GGVIAATNALGVGLDVPDRA		509
WRN from <i>H. sapiens</i>	TYHAGMSFST-----RKDIHHRFVRD-EIQVICATIAFGMGINKADIRQ		835
RecQ from <i>Metarhizium</i>	YHALREDSDSQFAAQREAGPQSWVQ--ESPVIIVATIALGTGIDIPGITH		1229
	*** : : : : * * * * * :		
	VI		
MusN from <i>A. nidulans</i>	VIHHSIPKSL E G Y Q E T G R A G R D G R R S G C Y L F S H R D V S T M Q S M I E K N E D		1050
QDE from <i>N. crassa</i>	VIHQHIPKSL E G Y Q E T G R A G R D G K P S D C Y L F A Y G D I Q S L R R M I A D G E		1252
SGS1 from <i>S. cerevisiae</i>	VVHFTVPTL E G Y Q E T G R A G R D G N Y S C I T Y P S F R D I R T M Q T M I Q D K N		1021
Dmb1m from <i>D. melanogaster</i>	VLHYSLPKSL E G Y Q E A G R A G R D G V A D C I L Y N Y S D M L R I K K M L D S D K A		1079
BLM from <i>H. sapiens</i>	VIHASLPKSL E G Y Q E S G R A G R D G E I S H C L L F Y T Y H D V T R L K R L I M M E K D		1010
TLH1 from <i>M. grisea</i>	VIHAGAPRLR D Y A Q E S G R A G R D G K S E A I V L R A G E G G V N T G L E V E M Y		559
WRN from <i>H. sapiens</i>	VIHYGAPK D M E S Y Q E I G R A G R D G L Q S S C H V L W A P A D I N L N R H L L T E I R N		885
RecQ from <i>Metarhizium</i>	VVHLDAFHSI I D Y A Q E S G R A G R A G E T M A E L V V E E R D W P A G -----		1270
	* * * * * : * * * * * * * :		

Fig.2. Comparação de seqüências entre os membros da RecQ DNA helicase, utilizando CLUSTAL X. Todas as análises foram conduzidas utilizando a região conservada nos domínios da proteína. As letras em negrito mostram as homologies nas regiões conservadas dos 7 domínios das helicases.

Acknowledgements/Agradecimentos

P.W.Inglis foi financiado pelo CNPq (bolsa de Pesquisador Visitante) e M.C.Valadares-Inglis foi bolsista de pós-doutorado do CNPq no Dept. of Genetics/University of Leicester/UK durante o desenvolvimento deste trabalho. Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BARTON, G. J. ALSCRIPT, a tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, p. 37-40, 1993.

BHATTACHARYYA, A.; BLACKBURN, E. H. *Aspergillus nidulans* maintains short telomeres throughout development. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 25, p. 1426-1431, 1997.

BLACKBURN, E. H.; CHALLONER, P. B. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, Cambridge, UK, v. 36, p. 447-457, 1984.

BOUCIAS, D. G.; TIGANO, M. S.; SOSA-GOMEZ, D. R.; GLARE, T. R.; INGLIS, P.W. Genotypic and phenotypic properties of the invertebrate mycopathogen *Nomuraea rileyi*. **Biological Control**, San Diego, CA, v. 19, p. 124-138, 2000.

DANILEVSKAYA, O.; SLOT, F.; PAVLOVA, M.; PARDUE, M. L. Structure of the *Drosophila* HeT-A transposon: a retrotransposon-like element forming telomeres. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, p. 215-224, 1994.

DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; LINDER, P. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. **Trends in Biochemical Sciences**, Oxford, UK, v. 24, p. 192-198, 1999.

FARGUES, J. F.; ROBERT, P. H. Effects of passage through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 576-583, 1983.

FORNEY, J. M.; HENDERSON, E. R.; BLACKBURN, E. H. Identification of the telomeric sequence of the acellular slime molds *Didymium iridis* and *Physarum polycephalum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 15, p. 9143-9152, 1987.

FESCHOTTE, C.; WESSLER, S. R. Treasures in the attic: rolling circle transposons discovered in eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 98, p.8923-8924, 2001.

GÚZMAN, P. A.; SANCHEZ, J. G. Characterization of the telomeric regions from *Ustilago maydis*. **Microbiology**, New York, NY, v. 140, p. 551-557, 1994.

HANAHAN, D., JESSEE, J.; BLOOM, F. R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 204, p. 63-113, 1991.

HENIKOFF, S. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 156-165, 1987.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSE, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.W.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford: CABI, 2001a. p. 23-48.

INGLIS, P. W.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES-INGLIS, M. C. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 49-52, 1999.

INGLIS, P. W.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, D. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; TIGANO, M. S.; MELLO, S. C. M. Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. **Current Microbiology**, New York, NY, v. 42, p. 194-198, 2001b.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, Amsterdam, v. 96, p. 23-28, 1990.

JONES, D. T. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 287, p. 797-815, 1999a.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 292, p. 195-202, 1999b.

KARPLUS, K.; BARRETT, C.; HUGHEY, R. Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. **Bioinformatics**, v. 14, p. 846-856, 1998.

KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. Rolling-circle transposons in eukaryotes **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 98, p. 8714-8719, 2001.

KELLEY, L. A.; MACCALLUM, R.; STERNBERG, M. J. E. Recognition of remote protein homologies using three-dimensional information to generate a position specific scoring matrix in the program 3D-PSSM. In: ISTRAIL, S, PEVZNER, P, AND WATERMAN, M. (Ed.). **RECOMB 99: Proceedings of the Third Annual Conference on Computational**. New York: The Association for Computing Machinery, 1999. p. 218-225.

LAL, S. K.; GIROUX, M. J.; BRENDDEL, V.; VALLEJOS, C. E.; HANNAH, L. C. The maize genome contains a helitron insertion. **Plant Cell**, Rockville, MD, v. 15, p. 381-391, 2003.

LEVIS, C.; GIRAUD, T.; DUTERTRE, M.; FORTINI, D.; BRYGOO, Y. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 267-272, 1997.

LEVIS, R. W.; GANESAN, R.; HOUTCHENS, K.; TOLAR, L. A.; SHEEN, F. M. Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. **Cell**, Cambridge, UK, v. 75, p. 1083-1093, 1993.

LOUIS, E. J. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 11, p. 1553-1573, 1995.

MAGALHÃES, B. P. Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In: MARTINS, M. T.; SATTO, M. I. Z.; TIEDJE, J. M.; HAGLER, L. C. N.; DOBEREINER, J.; SANCHEZ, P. S. (Ed.). **Progress in microbial ecology**. Santos: Brazilian Society for Microbiology: ICOME, 1997. p. 429-433.

MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; MOYZIS, R. K. Conservation of the human telomere sequence TTAGGG_n among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 86, p. 7049-7053, 1989.

PEARSON, W. R.; LIPMAN, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 85, p. 2444-2448, 1988.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.

POWELL, W. A.; KISTLER, H. C. *In vivo* rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 172, p. 3163-3171, 1990.

PRIOR, C. Discovery and characteristics of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In: LOMER, C. J.; PRIOR, C. (Ed.). **Biocontrol of locusts and grasshoppers**. Wallingford, UK: CABI, 1992. p. 159-180.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Manual**, A6: 1-10, 1988.

RYAN, M. J.; BRIDGE, P. D.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 93, p. 163-168, 2002.

RYCHLEWSKI, L.; JAROSZEWSKI, L.; LI, W.; GODZIK, A. Comparison of sequence profiles. Strategies for structural predictions using sequence information. **Protein Science**, Cambridge, UK, v. 9, p. 232-241, 2000.

SANCHEZ-ALONSO, P.; GUZMÁN, P. A. Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*. RecQ-like helicase motifs at telomeric regions. **Genetics**, Bethesda, MD, v. 148, p. 1043-1054, 1998.

SCHECHTMAN, M. G. Isolation of telomere DNA from *Neurospora crassa*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 7, p. 3168-3177, 1987.

SHIMIZU, S.; ARAI, Y.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic karyotype of *Metarhizium anisopliae*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, CA, v. 60:185-187, 1992.

TAKAHASHI, H.; OKAZAKI, S.; FUJIWARA, H. A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm *Bombyx mori*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 25, p. 1578-1584, 1997.

WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; KOCK, S. L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C. W.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**. Wallingford, UK: CABI, 2001. p. 253-287.

VALADARES-INGLIS, M. C.; PEBERDY, J. F. Variation in the electrophoretic karyotype of Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 11-14, 1998.

VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; RIBA, G. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, p. 88-93, 1998.

YAMADA, M.; HAYATSU, N.; MATSUURA, A.; ISHIKAWA, F. Y'-Help1, a DNA Helicase encoded by the yeast subtelomeric Y'element, is induced in survivors defective for telomerase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 33360-33366, 1998.

Isolamento de Sequência Associada a Telômero de *Metarhizium anisopliae* e Monomorfismo no Locus Subtelomérico de Fungos, Agentes de Controle Biológico

25

ZAKIAN, V. A. Structure and function of telomeres. **Annu. Ver. Genet.**, v. 23, p. 579-604, 1989.