

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

**ESTUDO FUNCIONAL DE GENES DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

TESE DE DOUTORADO

CHARLEY CHRISTIAN STAATS

PORTO ALEGRE, 2007.

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

**ESTUDO FUNCIONAL DE GENES DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

CHARLEY CHRISTIAN STAATS

ORIENTADOR: PROF. DR. AUGUSTO SCHRANK

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARILENE HENNING VAINSTEIN

PORTO ALEGRE, 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Augusto Schrank pelos diversos ensinamentos, não apenas de âmbito científico, assim como pela confiança depositada desde o início do mestrado.

Agradeço também à minha co-orientadora, Profa. Marilene Henning Vainstein, por ter me recebido em seu laboratório ainda no início da minha graduação para realizar estágio de iniciação científica em seu laboratório. Ainda pela ajuda e pela confiança.

Aos Profs. integrantes da comissão de acompanhamento, Giancarlo Pasquali e Marcia Furlaneto.

Aos demais Professores do PPGBCM.

Ao Prof. Gustavo Goldman e todos de seu laboratório, pelo auxílio e recebimento durante o meu estágio em seu laboratório.

A Lívia, pessoa de fundamental importância no desenvolvimento desta Tese, tanto cientificamente como pelo convívio.

A todos os colegas, antigos e atuais, do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Fungos Filamentosos (Ângela, Bárbara, Carolina, César, Juliana, Juliano, Lenise, Leonardo, Luciano, Mariana, Paulo, Tatiana e Valéria).

Agradecimento especial as minhas antigas ICs, Ângela e Mariana.

Aos colegas dos Laboratórios 220 (em especial à Irina pela ajuda na reta final com bioensaios e quantificações da atividade de quitinases), 222, 210 e 204.

À Profa. Célia Carlini pela doação de insetos para a realização de bioensaios.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia (Milton e Paulo, sem os quais não faríamos experimentos; Silvia e Luciano, obrigado por nos ajudar com os assuntos burocráticos).

Ao PIGS, pelas facilidades de seqüenciamento de DNA.

A CAPES, pela bolsa.

Ao CNPq pelo financiamento.

A minha família pelo apoio.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desta Tese.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	VII
Lista de Tabelas	VIII
Lista de Figuras	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	04
2.1. Características gerais do fungo filamentoso <i>Metarhizium anisopliae</i>	04
2.2. O estado da arte do processo de infecção do fungo <i>M. anisopliae</i>	06
2.3. O estudo de possíveis fatores de virulência em <i>M. anisopliae</i>	14
2.4. Caracterização de quitinases em fungos filamentosos	16
2.5. Atribuição da função gênica em fungos filamentosos por Agro-Transformação	26
3. Objetivos	32
3.1. Desenvolvimento experimental	33
3.1.1. Módulo I: Desenvolvimento de ferramentas para a análise da função gênica	33
3.1.2. Módulo II: Caracterização do gene <i>chi3</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
4. Módulo I: Desenvolvimento de ferramentas para a análise da função gênica	35
4.1. Introdução	35

4.2. Artigo “Gene inactivation mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in the filamentous fungi <i>Metarhizium anisopliae</i> ”	37
4.3. Construção de uma biblioteca de mutantes por Agro-transformação no fungo <i>M. anisopliae</i>	44
4.3.1 Materiais e métodos	45
4.3.1.1. Microrganismos	45
4.3.1.2. Agro-transformação	45
4.3.1.3. Seleção e análise molecular dos mutantes insercionais	46
4.3.1.4. Análise de sensibilidade à radiação UV-A	46
4.3.2. Resultados	48
4.3.3. Discussão	51
5. Módulo II: Caracterização do gene <i>chi3</i> de <i>Metarhizium anisopliae</i>	55
5.1. Introdução	55
5.2. Materiais e métodos	56
5.2.1. Manipulação de ácidos nucleicos	56
5.2.2. Análise da atividade de quitinases	60
5.2.3. Análise por PCR em tempo real dos transcritos do gene <i>chi3</i>	62
5.2.4. Análise da sobrevivência ao choque térmico	63
5.2.5. Microscopia	63
5.2.6. Bioensaios	63
5.3. Resultados	65
5.3.1. Clonagem e caracterização do gene <i>chi3</i> de <i>M. anisopliae</i>	65

5.3.2. Padrão de expressão do gene <i>chi3</i> em condições de estresse	68
5.3.3. Construção de um mutante com inativação do gene <i>chi3</i>	70
5.3.4. Caracterização fenotípica dos mutantes Δ <i>chi3</i>	72
5.3.5. Construção e caracterização de linhagens para expressão da fusão CHIT30:: <i>GFP</i>	83
5.4. Discussão	92
6. Conclusões	101
7. Perspectivas	102
8. Referências bibliográficas	103
9. Anexo I. Artigo “Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from <i>Metarhizium anisopliae</i> is encoded by an ortholog of the <i>chi3</i> gene”.	116
10. Anexo II. Artigo “Development of a simple and rapid <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation system for the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> ”.	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	graus Celsius
BD	borda direita
BE	borda esquerda
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
ESTs	<i>expressed sequence tags</i> (etiquetas de seqüências expressas)
<i>g</i>	força gravitacional
H	hora
IM	meio de indução
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> (espaçador interno transcrito)
kJ	kilojoules
kJ/m ²	kilojoules por metro quadrado
M	molar
MC	meio de Cove
MCc	meio de Cove Completo
mL	mililitros
MM	meio com sais de Cove
MMCT	meio com sais de Cove e aplicado choque térmico
MMS	meio com sais de Cove acrescido de 1 M de sorbitol
MMQC	meio com sais de Cove acrescido de 1 % de quitina coloidal
m ²	metro quadrado
NAG	N-Acetilglicosamina
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
kb	kilobase
LB	meio de Luria-Bertani
OD ₆₆₀	densidade ótica no comprimento de onda de 660 nm
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da DNA Polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RPM	rotações por minuto
TE	tampão Tris-EDTA
Ti	indutor de tumor
T-DNA	DNA de transferência
UV	radiação ultravioleta
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fatores de virulência descritos em <i>M. anisopliae</i>	15
Tabela 1.2. Quitinases de <i>Trichoderma reesei</i>	21
Tabela 5.1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	60
Tabela 5.2: Descrição das seqüências canônicas encontradas na região 5' flanqueadora do gene <i>chi3</i> .	68
Tabela 5.3: Susceptibilidade das linhagens selvagem e Δ chi3 a agentes desestabilizadores de parede celular.	73
Tabela 5.4: Mortalidade de <i>D. peruvianus</i> sobre efeito da linhagem selvagem (WT) e do mutante Δ chi3.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Aspectos morfológicos de <i>M. anisopliae</i>	05
Figura 1.2. Estrutura da cutícula de <i>Boophilus microplus</i>	09
Figura 1.3. Germinação de conídeos e diferenciação na cutícula de <i>B. microplus</i>	11
Figura 1.4. Estrutura molecular da quitina	16
Figura 1.5. Estrutura cristalográfica das quitinases ScCST1 e AfChiB1 de <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. fumigatus</i> , respectivamente	19
Figura 1.6: Representação do processo de transferência de material genético entre <i>Agrobacterium</i> e a célula fúngica	29
Figura 4.1: Morfologia de transformantes com alterações morfológicas.	48
Figura 4.2: Avaliação do padrão de integração do cassete <i>bar</i> ^R na biblioteca de mutantes insercionais	49
Figura 4.3: Sensibilidade à UV-A das linhagens selvagem e <i>albin1</i> .	50
Figura 5.1: Estratégia para a construção do plasmídeo p Δ chi3.	58
Figura 5.2: Estratégia para a construção da quitinase CHIT30 marcada com sGFP na sua porção C-terminal.	59
Figura 5.3: Obtenção de amplicons para a clonagem de parte da região 5' flanqueadora da região codificante do gene <i>chi3</i>	66
Figura 5.4: Organização genômica do gene <i>chi3</i> .	67
Figura 5.5: Mapa físico do gene <i>chi3</i>	68
Figura 5.6: Análise quantitativa da expressão do gene <i>chi3</i> em condições de estresse.	70
Figura 5.7: Construção de mutantes com inativação do gene <i>chi3</i> .	72

Figura 5.8: Cinética nuclear de <i>M. anisopliae</i> em MC em distintos períodos de tempo	75
Figura 5.9: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas secretadas pelas linhagens selvagem (WT) e mutante Δ chi3 em diferentes períodos de tempo.	76
Figura 5.10: Mortalidade de <i>D. peruvianus</i> sobre efeito da linhagem selvagem (WT) e do mutante Δ chi3.	78
Figura 5.11: Sobrevivência de conídeos germinados das linhagens ao choque térmico.	79
Figura 5.12: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas intracelulares das linhagens selvagem (WT) e mutante Δ chi3 após diferentes períodos de estresse térmico.	81
Figura 5.13: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas secretadas nos sobrenadantes de cultivo pelas linhagens selvagem (WT) e Δ chi3 após diferentes períodos de estresse térmico.	82
Figura 5.14: Fenótipo dos transformantes para expressão da fusão CHIT30::GFP visualizados por microscopia confocal. Ocorre acúmulo de fluorescência verde nas extremidades das hifas.	86
Figura 5.15: Detecção da proteína de fusão CHIT30::GFP	87
Figura 5.16: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem fuschi3 em presença de NAG	89
Figura 5.17: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem fuschi3 em presença de quitina coloidal	90
Figura 5.17: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem fuschi3 em presença de quitina coloidal (continuação)	91

RESUMO

O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* é o entomopatógono melhor caracterizado em nível molecular, em especial em relação a sua patogênese, principalmente pelo isolamento de genes diferencialmente expressos durante a infecção de hospedeiros. A infecção é um processo multifatorial complexo e os genes candidatos devem ser analisados funcionalmente. Para tal, uma das estratégias mais bem sucedidas é o desenvolvimento de sistemas para a geração de mutantes nulos por inativação gênica, mediada por recombinação homóloga. Neste trabalho, esta estratégia foi aplicada ao fungo *M. anisopliae* por intermédio da Agro-transformação. Inicialmente, padronizamos este sistema utilizando como alvo o gene *trp1* deste fungo, envolvido no anabolismo do aminoácido triptofano. Obtivemos uma freqüência de recombinação homóloga em torno de 20 % para este *locus*. Como a integração do DNA exógeno é majoritariamente ectópica, nos valemos desta característica para construir uma biblioteca de mutantes de inserção e procedemos a uma caracterização preliminar de conídeos de mutantes morfológicos em relação a sua sensibilidade à radiação UV-A. Mostramos assim que este sistema é aplicável para o estudo funcional de genes no fungo. Dentre os prováveis fatores envolvidos no processo de infecção de *M. anisopliae* estão algumas hidrolases e o nosso grupo tem se dedicado a caracterização das quitinases neste fungo. As quitinases em particular são atraentes do ponto de vista de sua função, pois estão presentes em todos os fungos para o remodelamento da sua parede celular, composta por quitina, nos processos de crescimento e diferenciação, mas também nos processos de nutrição e patogênese. No sentido de estudar a função de um gene específico caracterizamos o gene *chi3*, o qual codifica para a quitinase bifuncional CHIT30. Clonamos a região 5' flanqueadora e a análise *in silico* revelou a presença de possíveis elementos canônicos de regulação, dentre eles um associado à resposta ao choque térmico. Análises por qRT-PCR revelaram aumento dos níveis de transcritos do gene *chi3* em condições de estresse térmico. Mutantes inativados

deste gene foram gerados por Agro-transformação e os mesmos apresentaram menor produção de quitinases após o choque térmico e maior TL50 em bioensaios utilizando como modelo o inseto *Dysdercus peruvianus*. Para determinar a localização subcelular da quitinase CHIT30 foram gerados transformantes com um cassete para a expressão da proteína de fusão CHIT30 marcada com a proteína repórter GFP. Análises por microscopia confocal revelaram que a proteína de fusão está associada à parede celular, provavelmente seguindo a via de secreção de proteínas. Nossos resultados mostram que o gene *chi3* apresenta regulação complexa. A expressão da quitinase CHIT30 de forma constitutiva parece ser letal e os mutantes nulos não demonstraram fenótipos claramente detectáveis em experimentos convencionais. O mutante $\Delta chi3$ apresentou eficiência diminuída na infecção do inseto *D. peruvianus* e a sua função na biologia do fungo é também complexa e ainda requer melhor detalhamento.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is the best characterized entomopathogenic fungus at the molecular level. The cloning of differentially expressed genes during the infection process is the main approach to study the infection process. The search for pathogenicity determinants has revealed that the process is complex and multifactorial. The characterization of putative genes related to the infection process has been made by the generation of null mutants via homologous recombination at the wild-type loci by using inactivation cassettes. In this work, we have developed a strategy for the generation of null mutants of the tryptophan anabolic gene *trp1*. Using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT), 22% efficiency of homologous recombination at the *trp1* locus was achieved. Due to the high frequency of ectopic integration of the *trp1* gene inactivation cassette, we applied this as a tool to generate an insertional library to isolate functional mutants. Morphological mutants were tested for their susceptibility to UV-A radiation. Therefore, we demonstrated the feasibility of this methodology in forward genetics studies in *M. anisopliae*. During fungal penetration through the host cuticle, hydrolases are thought to be crucial for infection consolidation. Chitinases are some of these enzymes and could be involved in cell wall modification or nutrient acquisition and pathogenicity. In order to contribute to the understanding of the role of specific chitinase genes in *Metarhizium*, we further characterized the CHIT30 chitinase encoding gene *chi3*. The 5' upstream cloning and *in silico* analysis showed that some putative regulatory sequences are present, in particular a stress response element. Quantitative RT-PCR analysis detected an increase in *chi3* transcripts during heat-shock. ATMT gene inactivation was conducted for the *chi3* gene. Mutants produced a lower level of chitinases during heat shock and were less virulent to the insect *Dysdercus peruvianus*. To uncover the subcellular localization of the CHIT30 chitinase, we have generated transformants to produce a GFP labelled CHIT30. Confocal microscopy analysis

showed that the fusion protein was located at the cell wall. The *chi3* gene possesses a complex regulation and the constitutive expression of the CHIT30 chitinase appears to be lethal. Null *chi3* gene mutants were less virulent to the insect *Dysdercus peruvianus*. The function of this gene in virulence to insects is not clear. More studies will be necessary to fully understand the role of chitinases in fungi.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação, em larga escala, do seqüenciamento de genomas abre novas perspectivas para a elucidação de diversos fenômenos bioquímicos e fisiológicos da célula. As novas metodologias de seqüenciamento (AHMADIAN *ET AL.*, 2006) associadas àquelas de análise da expressão global (BREAKSPEAR & MOMANY, 2007) e as análises proteômicas (KUNG & SNYDER, 2006) estão revolucionando a Biologia, permitindo a descrição de mecanismos básicos que tem aplicação direta em várias áreas da atividade humana.

No caso do Reino dos Fungos, que atualmente (outubro de 2007) tem 20 genomas seqüenciados, publicados e de acesso público e mais de 200 em progresso (<http://www.genomesonline.org>, LILIOS *ET AL.*, 2006), inúmeras vias metabólicas estão sendo descritas em nível molecular. Por exemplo, a descrição detalhada da maquinaria envolvida na secreção de proteínas de fungos utilizados para a produção heteróloga de proteínas como *Aspergillus niger* (DAVE *ET AL.*, 2006; PEL *ET AL.*, 2007) e a descoberta de diversos genes até então desconhecidos, envolvidos em vias de interação entre fungos patogênicos e seus hospedeiros (CHOW *ET AL.*, 2007; DA SILVA FERREIRA *ET AL.*, 2007; EIGENHEER *ET AL.*, 2007; LOFTUS *ET AL.*, 2005, XANDER *ET AL.*, 2007). O conhecimento gerado por essas metodologias pode ser aplicado na descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças oportunistas causadas por fungos em humanos, como é o caso da criptococose e da aspergilose, e em plantas, como é o caso do comprometimento do arroz pelo fitopatógeno *Magnaporthe grisea* (XU *ET AL.*, 2006).

No fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae*, um dos agentes de controle biológico mais aplicados e um dos mais bem caracterizados, as interações entre parasita e hospedeiros estão sendo intensamente estudadas. O objetivo é conhecer melhor as estratégias utilizadas pelo fungo para infectar seus hospedeiros visando à descoberta dos mecanismos da

especificidade por hospedeiro, caracterizar o conjunto de proteínas secretadas na presença de diferentes tipos de hospedeiros, assim como as proteínas produzidas durante os diferentes estágios de infecção de um determinado hospedeiro.

Uma estratégia comum utilizada por *M. anisopliae* para a infecção de qualquer de seus hospedeiros, é a transposição da cutícula, que é direta e iniciada pela deposição de partículas infectivas na cutícula dos hospedeiros. Os esforços têm sido direcionados para a compreensão dos eventos moleculares que controlam a infecção, como o seqüenciamento de ESTs (FREIMOSER *ET AL.*, 2001), o isolamento de genes diferencialmente expressos (DUTRA *ET AL.*, 2004, SMALL & BIDOCHKA, 2005) e a análise do padrão global de expressão gênica pela hibridização em microarranjos de DNA (WANG *ET AL.*, 2005; WANG & ST. LEGER, 2005). Um dos pontos cruciais no sucesso da infecção é a secreção de uma série de enzimas para a hidrólise dos componentes majoritários da cutícula dos artrópodes, como ceras, proteínas e quitina.

As quitinases são enzimas envolvidas na hidrólise de quitina, o segundo polímero em massa na natureza, apenas superado pela celulose. Em fungos filamentosos, as quitinases apresentam pelo menos duas funções: a aquisição de nutrientes/infecção e a morfogênese durante o crescimento das hifas e nos processos de diferenciação celular. O fungo *M. anisopliae* produz pelo menos seis diferentes quitinases secretadas, como detectado em zimogramas de atividade quitinolítica de sobrenadantes de cultivos em meio mínimo contendo quitina (linhagem E6; PINTO *ET AL.*, 1997, SILVA *ET AL.*, 2005). Nosso grupo (Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Fungos Filamentosos – Centro de Biotecnologia – UFRGS) purificou uma destas quitinases com massa molecular de 30 kDa (CHIT30) que mostrou pela primeira vez a exibir ambas as atividades de endo e de exoquitinase no mesmo polipeptídeo. Na continuidade deste trabalho, utilizando anticorpos contra esta quitinase, foi

comprovada a sua expressão durante o processo de infecção do carrapato *Boophilus microplus* e o cDNA do gene *chi3* foi clonado de uma biblioteca de expressão (SILVA ET AL., 2005).

A continuidade deste trabalho visa inferir a função da quitinase CHIT30 no sistema quitinolítico do fungo *M. anisopliae*. O presente trabalho descreve a clonagem e a caracterização do gene da enzima CHIT30, a construção de mutantes nulos e a sua análise quanto à patogenicidade a diferentes hospedeiros e a construção de uma proteína de fusão com uma proteína repórter para analisar a sua localização celular. Para possibilitar essas análises foi desenvolvido um sistema para a geração de mutantes nulos em *M. anisopliae* por recombinação homóloga usando como ferramenta a Agro-transformação tendo como alvo inicial o gene *trp1*, devido à facilidade da detecção fenotípica de seus mutantes nulos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FUNGO FILAMENTOSO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

O fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* é um entomopatógeno com ampla variedade de hospedeiros, sendo capaz de infectar e matar cerca de 300 diferentes espécies de insetos e artrópodes (ROBERTS & ST. LEGER, 2004). Este fungo tem sido utilizado como estratégia para o controle biológico de cigarrinhas da cana-de-açúcar e de cigarrinhas das pastagens no Brasil e na Venezuela, larvas de escaravelhos em pastagens na Austrália e gafanhotos e cupins nos Estados Unidos (BUTT *ET AL.*, 2001, LORD, 2005).

Morfologicamente, *M. anisopliae* é filamentoso com micélio hialino e septado, dotado de conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas (Figura 1.1). Suas formas de reprodução conhecidas compreendem a assexual, a qual é própria do crescimento vegetativo, e a parasexual, caracterizada por fenômenos como a heterocariose e a recombinação somática (ARRUDA, 2005; ARRUDA *ET AL.*, 2005). Os teleomorfos são raros, sendo somente descrito o isolamento de *Cordyceps brittlebankisoides*, cujo anamorfo é *M. anisopliae* var. *majus* (LIU *ET AL.*, 2001). O desenvolvimento vegetativo ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura e pH ótimos entre 24 e 30 °C e 6,9, respectivamente, apesar da tolerância a um intervalo de pH relativamente alto (2,0 a 8,5). (ARRUDA, 2005).

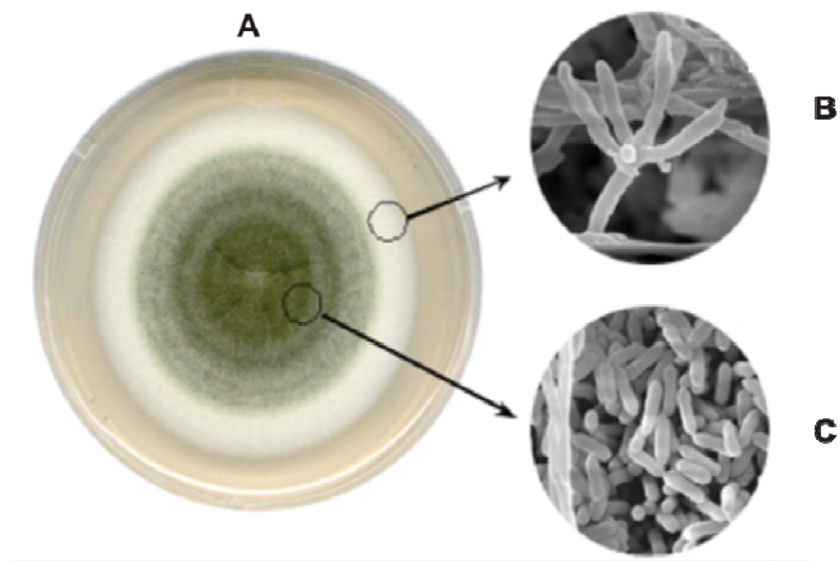


Figura 1.1: Aspectos morfológicos de *M. anisopliae*. Colônia em meio de cultura completo (MCC) após 21 dias a 28 °C. Pode ser observado o micélio de coloração branca (A), de onde emergem os conidióforos (B), os quais dão origem a conídios cilíndricos (C). As micrografias de MEV são de autoria de W. Arruda (ARRUDA ET AL., 2005)

O fungo *M. anisopliae* é atualmente classificado no Filo Ascomycota após o isolamento da fase teleomórfica de *M. anisopliae* var. *majus*, *C. brittlebankisoides* (LIU ET AL., 2001). Segundo a classificação proposta por DRIVER e colaboradores (2000), tomando como base caracteres morfológicos, assim como as seqüências nucleotídicas de ITS (*internal transcribed spacers*), da região D3 do rDNA 28S e do rDNA 5.8S, as espécies descritas para o gênero *Metarhizium* são *Metarhizium album*, *M. anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*. *M. anisopliae* possui ainda quatro variedades: var. *acridum* Driver & Milner, var. nov.; var. *lepidiotum* Driver & Milner, var. nov.; var. *anisopliae* e var. *majus*. Já *M. flavoviride* apresenta-se sobre cinco variedades: Tipo E; var. *novazealandicum* Driver & Milner, var. nov.; var. *flavoviride*; var. *minus*; var. *pemphigum* Driver & Milner, var. nov. (DRIVER, 2000). Recentemente, uma nova variedade de *M. anisopliae* foi descrita na China, a var. *Dcjhyium* (DONG ET AL., 2007).

Ensaio utilizando a capacidade entomopatogênica de *M. anisopliae* têm sido conduzidos em diversos vetores de doenças humanas como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (SCHOLTE ET AL., 2007), o mosquito transmissor da malária *Anopheles gambiae* (SCHOLTE ET AL., 2006), o vetor da doença de Chagas *Triatoma infestans* (JUAREZ ET AL., 2000); moscas tsé-tsé, *Glossina* sp (KAAYA & MUNYINYI, 1995), assim como pragas de interesse agropecuário, como os carrapatos de bovinos *Boophilus microplus* (FRAZZON ET AL., 2000), *Ixodes scapularis* (HORNBOSTEL ET AL., 2005) e *Amblyomma variegatum* (MARANGA ET AL., 2005), os vetores de doenças associadas ao milho *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* e *Dalbulus maidis* (TOLEDO ET AL., 2007) e diversos outros insetos vetores de doenças. Sua utilização para o controle de mosquitos transmissores da malária é ainda controverso (THOMAS & READ, 2007).

2.2. O ESTADO DA ARTE DO PROCESSO DE INFECÇÃO DO FUNGO *M. ANISOPLIAE*

O ciclo de infecção do fungo *M. anisopliae* é complexo e ocorre pela penetração direta da cutícula dos hospedeiros artrópodes. É dependente de diversos fatores ambientais e do *status* metabólico da célula, podendo ser esquematicamente dividido em adesão, germinação, formação de apressório, formação de grampo de penetração, penetração propriamente dita, colonização, reprodução do patógeno e disseminação (ARRUDA ET AL., 2005 e referências citadas).

O início do processo se dá pela deposição de conídios na superfície do hospedeiro e o desencadeamento da infecção depende da sua viabilidade. Estudos utilizando uma linhagem de *M. anisopliae* expressando um gene repórter (proteína verde fluorescente – GFP) mostraram que esta linhagem é capaz de permanecer em diferentes tipos de solos por um

período superior a um ano em condições ambientais. Foi demonstrado também que ocorre um gradiente decrescente da concentração de esporos à medida que aumenta a profundidade do solo não rizosférico analisado. A concentração de conídeos em solos rizosféricos, entretanto, não sofre um declínio tão acentuado, provavelmente devido aos metabólitos secundários secretados pelas raízes, que provêm fontes para nutrição, bem como proteção contra a radiação solar (HU & ST. LEGER, 2002). Estudos posteriores do mesmo grupo utilizaram o seqüenciamento de etiquetas expressas (ESTs) e posterior hibridização em microarranjos de DNA a partir de *pools* de cDNA oriundos de RNA extraído de *M. anisopliae* exposto a exsudados de raiz de feijão. Os resultados obtidos mostraram um programa de regulação da expressão gênica voltado à privação de nutrientes (WANG *ET AL.*, 2005).

A adesão propriamente dita é o resultado do reconhecimento da estrutura cuticular do hospedeiro pelo conídeo. A adesão é dependente da topologia assim como da constituição química da cutícula dos hospedeiros (LORD & HOWARD, 2004; SOSA-GOMEZ *ET AL.*, 1997). O conídeo possui em sua superfície proteínas apolares, as hidrofobinas, que são responsáveis pela interação com a camada lipídica presente na superfície dos hospedeiros, desta forma permitindo a adesão (FANG *ET AL.*, 2007; ST. LEGER *ET AL.*, 1992). Recentemente foi demonstrada a participação de uma adesina, codificada pelo gene *MADI*, na adesão de conídeos à cutícula de larvas de *Manduca sexta*. Mutantes nulos deste gene tiveram diminuída a sua germinação na cutícula do hospedeiro, além de diminuída virulência (WANG & ST. LEGER, 2006).

Tendo aderido o conídeo à superfície do hospedeiro, ocorre o início da fase de penetração, na qual o fungo transpõe a cutícula. Trata-se da principal barreira química e física à infecção, sendo estruturalmente dividida em epicutícula e pró-cutícula. Uma fina camada de natureza lipídica (ceras) recobre a epicutícula, de natureza protéica (Figura 1.2, ARRUDA *ET*

AL., 2005; PEDRINI ET AL., 2007). A fina camada lipídica tem função importante no reconhecimento por parte do fungo, e conseqüente adesão, pois é a primeira estrutura com a qual o esporo entra em contato com seu potencial hospedeiro. Esta etapa é provavelmente definitiva para o estabelecimento das que se seguem e pode representar a definição da especificidade da infecção. Em condições ambientais apropriadas, ocorre a germinação. Relatos recentes mostram que os componentes da camada lipídica, tanto de natureza polar quanto apolar, podem promover a germinação de conídeos de *M. anisopliae* em asas do gafanhoto *Schistocerca gregaria* antes da penetração propriamente dita (JARROLD ET AL., 2007). Há ainda a liberação de pelo menos cinco diferentes proteases, provavelmente envolvidas na degradação de proteínas da epicutícula, fato que promoveria a germinação (QAZI & KHACHATOURIANS, 2007).

A extremidade distal do tubo germinativo se diferencia em uma estrutura caracterizada pela dilatação da hifa, o apressório, com o conseqüente acúmulo interno de açúcares. A alta concentração de açúcares é responsável pela geração de pressão osmótica, necessária para a penetração (Figura 1.3, WANG & ST. LEGER, 2007a). Diversos mecanismos controlam a formação do apressório em *M. anisopliae*. A baixa concentração de nutrientes e a natureza hidrofóbica do suporte sobre o qual se desenvolve o tubo germinativo são fundamentais para a diferenciação da extremidade distal da hifa em apressório *in vitro* (ST. LEGER ET AL., 1989). Recentemente, foi elucidada a participação do gene *Mp11*, o qual codifica uma perilipina, no desenvolvimento de apressório em *M. anisopliae*. Perilipinas são proteínas que circundam gotículas de lipídeos no interior da célula como forma de armazenamento. Linhagens de *M. anisopliae* onde o gene *Mp11* foi inativado, mostraram deficiência no processo de infecção devido à formação de apressório com menor quantidade de gotículas de lipídeos, levando à menor turgor e conseqüente menor pressão osmótica, acarretando em deficiências na penetração por estes apressórios (WANG & ST. LEGER, 2007a).

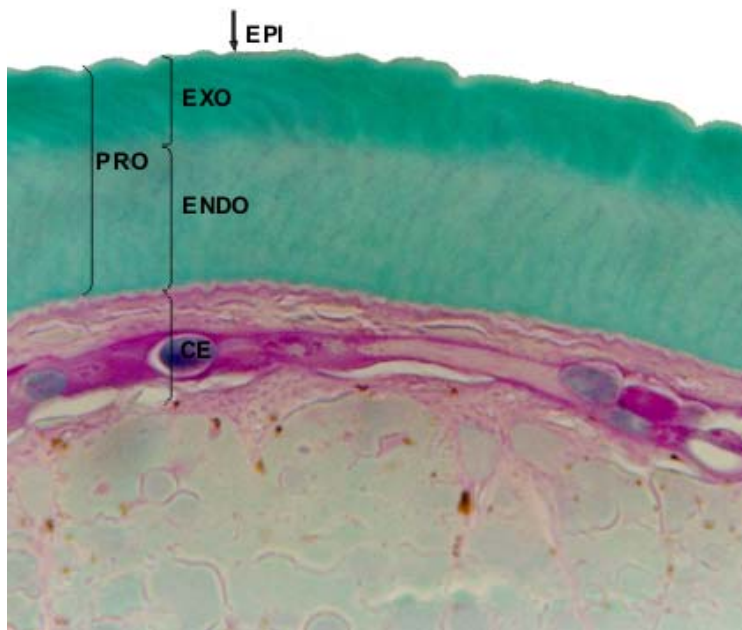


Figura 1.2: Estrutura da cutícula de *Boophilus microplus*. Fotomicrografia de microscopia óptica evidenciando a distribuição de componentes da cutícula de artrópodes. Coloração de PAS, evidenciando o grande grau de açúcares da pró-cutícula. Aumento de 640 X. EPI, epicutícula (seta); PRO, Pró-cutícula; EXO, exocutícula; ENDO, endocutícula e CE, células epidérmicas (ARRUDA *ET AL.*, 2005).

Na face do apressório que está em contato com a cutícula ocorre a formação de uma estrutura denominada de grampo de penetração, que está diretamente relacionado ao processo de penetração. Evidências histoquímicas e ultraestruturais sugerem que a etapa de penetração evolui da combinação de pressão mecânica e atividade enzimática (ARRUDA *ET AL.*, 2005; ST. LEGER *ET AL.*, 1996ab). A cutícula de insetos tem como composição química majoritária proteínas e quitina. Desta forma, proteases e quitinases desempenham papel fundamental na degradação da cutícula por fungos filamentosos (PEDRINI *ET AL.*, 2007).

As proteases de *M. anisopliae* têm sido alvo de intensos estudos. Durante o processo infectivo do hospedeiro *M. sexta*, pelo menos 14 isoformas de proteases com pI variando entre 4,5 e 10 podem ser detectadas por zimogramas (ST. LEGER *ET AL.*, 1998). Dentre as

proteases produzidas por *M. anisopliae*, as subtilisinas estão em maior número, sendo 11 os genes que codificam para as diferentes isoformas destas enzimas (Pr1A – Pr1K, BAGGA ET AL., 2004). Quando relacionadas diretamente como fatores de virulência, há demonstração de que linhagens com expressão aumentada da protease Pr1A apresentam maior patogenicidade ao hospedeiro *M. sexta* (ST. LEGER ET AL., 1996c). Mutantes espontâneos com deleção cromossômica para o gene *pr1A* de *M. anisopliae* foram isolados e, apesar destes mutantes não apresentarem diferenças de virulência para larvas de *Galleria mellonella*, ensaios utilizando larvas de *Tenebrio molitor* mostraram redução na capacidade infectiva do mutante quando comparado ao tipo-selvagem (WANG ET AL., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa. Linhagens de *M. anisopliae* com expressão aumentada e constitutiva do gene *pr1A* foram mais infectivas, em relação à linhagem selvagem, para larvas da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*, ao passo que não foram detectadas diferenças de infectividade quando o hospedeiro era o carrapato *B. microplus* (FRANCESCHINI, 2005). Desta forma, pode haver secreção de diferentes subtilisinas dependendo do hospedeiro infectado por *M. anisopliae*.

As quitinases, enzimas que degradam o polímero formado por ligações β -1-4 de N-acetilglicosamina, também têm um possível papel durante o processo de penetração. Evidências imunohistoquímicas revelaram a liberação em baixos níveis de uma quitinase com massa molecular de 42 kDa (quitinase CHIT42) durante a formação do apressório e em um período relativamente longo no desenvolvimento da infecção (ST. LEGER ET AL., 1996a). Entretanto, a construção de linhagens com expressão aumentada desta proteína não acarreta em aumento da virulência contra larvas da mariposa *M. sexta* (SCREEN ET AL., 2001). Recentemente, foi evidenciada a presença da quitinase CHIT30 durante o processo de infecção do carrapato *B. microplus* (SILVA ET AL., 2005). É sugerido que a atividade quitinolítica decorre à proteolítica, fato esse devido à estrutura física da cutícula de insetos: as

fibras de quitina funcionam como sítio de ancoramento para algumas proteínas, estando recobertas por uma matriz de natureza protéica (ST. LEGER *ET AL.*, 1996ab).

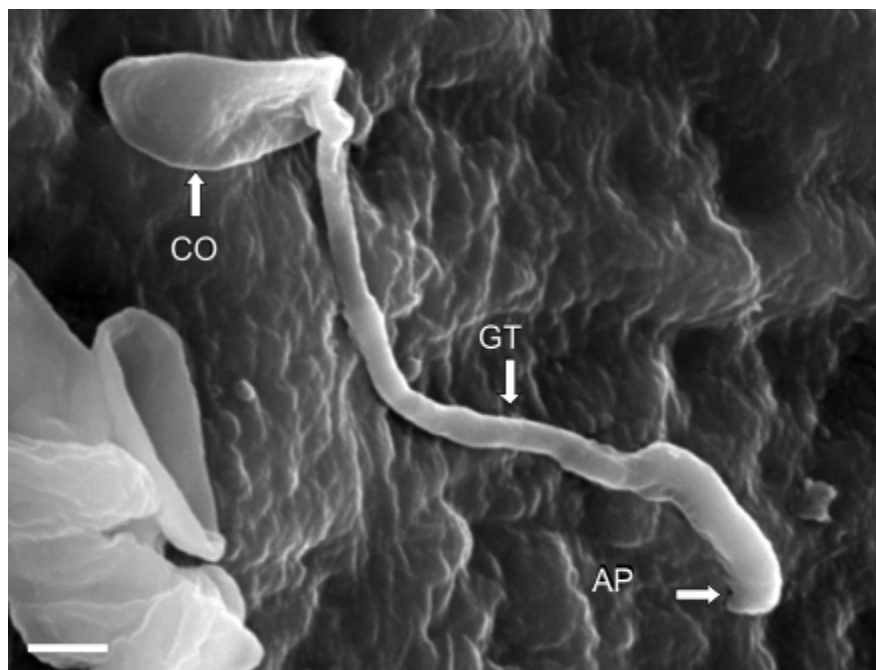


Figura 1.3: Germinação de conídeos e diferenciação na cutícula de *B. microplus*. Micrografia eletrônica de varredura evidenciando a formação de um conídeo (CO), formando um tubo germinativo (GT), na extremidade do qual é formada o apressório (AP). Barra, 2 μ m. (ARRUDA *ET AL.*, 2005).

Em uma análise por microarranjos de DNA confrontando RNA obtido a partir de cultivos de *M. anisopliae* em meio contendo cutícula de larvas de *M. sexta*, foi observado um programa de expressão gênica voltado à solubilização dos componentes da cutícula, visto o aumento da expressão de subtilisinas e tripsina para degradação do componente protéico da cutícula; quitinases, glicanases e glicosidases, servindo para a hidrólise e utilização como fonte de nutrição do componente glicídico da cutícula. Além disso, uma diversidade de genes envolvidos em processos fisiológicos como sinalização celular, reorganização celular, síntese de metabólitos secundários e resposta ao estresse estão modulados nesta análise que mimetiza as condições de infecção (WANG *ET AL.*, 2005).

A capacidade de *M. anisopliae* em infectar diferentes tipos de hospedeiros decorre de um programa de expressão gênico próprio para a infecção de um determinado tipo de hospedeiro. Aparentemente, a topografia da superfície do hospedeiro ou os compostos químicos presentes permitem ou não a germinação. Uma determinada linhagem de *M. anisopliae* (ARSEF 324) é conhecida por infectar especificamente apenas um hospedeiro, dentre todos até hoje testados, o gafanhoto *S. gregaria*. O ciclo de infecção da linhagem ARSEF 324 somente se completa neste hospedeiro, ao passo que nenhuma germinação ocorre no besouro *Leptinotarsa decimlineata* e pouca germinação ocorre na cigarra *Magicicada septendecim*, indicando que o processo de infecção pode sofrer interrupção de continuidade em diversas etapas do seu desenvolvimento (WANG & ST. LEGER, 2005). Estudos utilizando extratos orgânicos destes diferentes insetos mostraram que aqueles oriundos do gafanhoto e da cigarrinha são capazes de induzir a germinação. Entretanto, apenas o extrato de gafanhoto é capaz de induzir a diferenciação para a formação de apressório em um sistema *in vitro*. As diferenças encontradas entre a capacidade de germinação e de formação de apressório em hospedeiros susceptíveis ou não se devem basicamente à expressão diferencial de genes envolvidos na transdução de sinais em hospedeiros susceptíveis (WANG & ST. LEGER, 2005).

Após a penetração, as células oriundas do grampo de penetração atingem a hemocele e se diferenciam em blastosporos, células derivadas de hifas, mas de menor tamanho que provavelmente facilita a sua circulação na hemolinfa e conseqüente disseminação no corpo do hospedeiro. O gene da adesina *MADI*, além de influenciar a adesão e a germinação, controla também a formação de blastosporos, visto que mutantes nulos deste gene não são capazes de formar estas células *in vitro*, desenvolvendo-se como tubos germinativos (WANG & ST. LEGER, 2007b). Outro gene aparentemente associado à formação de blastosporos é o gene *cag8*, isolado pela construção de uma biblioteca de genes expressos durante a conidiogênese

em privação de nutrientes (SMALL & BIDOCHKA, 2005). Posteriormente foi demonstrado que este gene codifica para uma proteína reguladora da via de sinalização mediada por proteínas G. Mutantes nulos deste gene não produziam conídeos tanto *in vitro* quanto em condições de infecção, têm o crescimento de hifas reduzido, apresentam diminuição da virulência a larvas de *G. mellonella* e produzem blastosporos irregulares (FANG ET AL., 2007).

Na hemocele, a alta concentração de trealose e de outros açúcares, além de aminoácidos e proteínas, oferecem um ambiente rico em nutrientes para o desenvolvimento do fungo. ZHAO e colaboradores (2006) relataram experimentos de infecção experimental do gafanhoto *Locusta migratoria manilensis* mostrando a expressão do gene *ntl-1*, o qual codifica para uma trealase, durante a infecção, assim como a presença desta enzima na hemolinfa de gafanhotos infectados.

O sistema de infecção de *M. anisopliae* ainda é caracterizado pela síntese de destruxinas, peptídeos cíclicos com atividade ionófora, cujos efeitos principais são paralisia muscular e inibição da função de hemócitos e túbulos de Malpighi (BIDOCHKA ET AL., 1997; KERSHAW ET AL., 1999), além da supressão do sistema imune inato do hospedeiro (PAL ET AL., 2007).

Um componente de defesa de *M. anisopliae* contra o sistema imune de insetos é a expressão de uma forma de colágeno na superfície de conídeos e blastosporos que impede o reconhecimento e ataque de hemócitos, células do sistema imunológico de insetos. Mutantes nulos deste gene (*Mcl1*) apresentam virulência diminuída contra larvas de *M. sexta* e são facilmente encapsulados por hemócitos presentes na hemolinfa da larva (WANG & ST. LEGER, 2006).

O programa de expressão gênica de *M. anisopliae* no estágio de colonização e disseminação pela hemolinfa é bastante diferente daquele presente na fase de penetração. Os blastosporos são possivelmente formados em decorrência ao aumento da expressão de genes envolvidos na formação de pseudohifas e ocorre também o aumento da expressão de genes relacionados à aquisição de nutrientes, como aspártico-proteases, glicosidases e enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares (WANG *ET AL.*, 2005).

Ainda, na fase de colonização e disseminação pela hemolinfa, ocorre a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse e detoxificação. Há aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo de esteróis em resposta ao choque hiperosmótico, o qual é originado pela alta concentração de açúcares na hemolinfa. Há também a expressão de genes para detoxificação de metabólitos oriundos do sistema imune do hospedeiro, como catalase e outras enzimas envolvidas no metabolismo de formas reativas de oxigênio. O aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários e de peptídeos tóxicos para imobilização e morte do hospedeiro também ocorre durante a colonização do hospedeiro (WANG *ET AL.*, 2005).

2.3. O ESTUDO DE POSSÍVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *M. ANISOPLIAE*

A interação parasita/hospedeiro de *M. anisopliae* vem sendo estudada mais recentemente pelo isolamento de genes diferencialmente expressos empregando basicamente três metodologias: (i), a clonagem de ESTs diferencialmente expressos por PCR supressivo; (ii), a construção de bibliotecas de ESTs e (iii), a hibridização em microarranjos de DNA. A construção e análise de bibliotecas de subtração foram realizadas pela comparação entre genes expressos em cultivos do fungo em meio sem privação de nutrientes com aqueles expressos

em meios que mimetizam condições de infecção (DUTRA *ET AL.*, 2004; SMALL & BIDOCHKA *ET AL.*, 2005). O seqüenciamento de ESTs, por sua vez, foi realizado a partir de cultivos apenas em condições que mimetizam a infecção (FREIMOSER *ET AL.*, 2003; WANG *ET AL.*, 2005). Os estudos para o detalhamento dos programas de expressão gênica global revelados pela hibridização em microarranjos de DNA com RNA foi realizado a partir da comparação entre cultivos em privação de nutrientes ou cutículas de diferentes tipo de hospedeiros (FREIMOSER *ET AL.*, 2005), cultivos em cutículas de insetos suscetíveis ou não suscetíveis a infecção (WANG & ST. LEGER, 2005) ou de cultivos em exsudados de plantas, hemolinfa ou cutículas de insetos (WANG *ET AL.*, 2005).

A Tabela 1.1 mostra os genes que foram descritos como fatores de virulência de *M. anisopliae* a partir destes experimentos.

Tabela 1.1: Fatores de virulência descritos em *M. anisopliae*.

Gene	Função	Efeitos no mutante nulo	Referência
<i>Mpl1</i>	Perilipina	Turgor do apressório diminuído	WANG & ST. LEGER, 2007A.
<i>Mad1</i>	Adesina	Adesão, germinação e formação de blastosporos diminuídos	WANG & ST. LEGER, 2007B.
<i>Mcl1</i>	Colágeno	Sensibilidade ao sistema imune do hospedeiro aumentada	WANG & ST. LEGER, 2006.
<i>Cag8</i>	Regulador de Proteínas G	Conidiação, crescimento de hifas e formação de blastosporos diminuídos	FANG <i>ET AL.</i> , 2007.
<i>Pr1A*</i>	Protease	Diminuição de virulência hospedeiro-específica	WANG <i>ET AL.</i> , 2002.

* Caracterização independente de estudos de isolamento de genes diferencialmente expressos.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES EM FUNGOS FILAMENTOSOS

A quitina, um polissacarídeo linear insolúvel formado por ligações β -1,4 de unidades de 2-acetoamino-2-deoxi-D-glicopiranosose (N-acetilglicosamina, NAG, Figura 1.4), é muito ubíqua na natureza, sendo superado em massa apenas pela celulose. Geralmente é encontrada constituindo o exoesqueleto de insetos, carapaça de crustáceos, em conchas de moluscos, em nematóides e como principal componente da parede celular de fungos (CABIB, 1987; DUOCHUON, 2006).

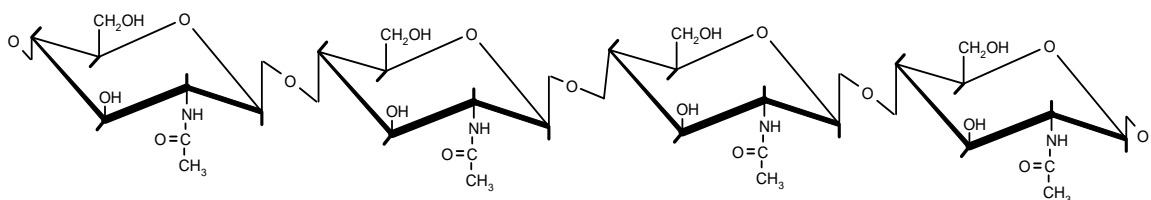


Figura 1.4: Estrutura molecular da quitina.

As quitinases hidrolisam a ligação glicosídica existente no polímero, resultando na produção de oligômeros e monômeros de NAG, os quais podem ser posteriormente metabolizados por diversos organismos. A nomenclatura das quitinases tem sido alvo de intensa discussão, não tendo sido ainda obtido um consenso sobre a definição das enzimas pertencentes ao complexo quitinase. Dentro deste complexo, podem ser classificadas as enzimas que degradam quitina, sejam elas endoquitinases (EC 3.2.1.14) ou exoquitinases, as quais podem ainda ser subdivididas em quitobiosidases (EC 3.2.1.29) e β -(1,4)-N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.30). A diferença entre estas enzimas consiste no ponto de hidrólise dentro no polímero quitina. As endoquitinases reconhecem pontos internos na molécula de quitina, liberando múltiplos de NAG, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. As quitobiosidases, por sua vez, levam a formação de dímeros, quitobiose, a partir da hidrólise na extremidade redutora da molécula de quitina. Já as β -(1,4)-N-

acetilglicosaminidases hidrolisam quitobiase e oligômeros, como quitotetraose e quitotreose no monômero NAG (DUO-CHUAN, 2006).

Análises filogenéticas permitem ainda a classificação das quitinases em famílias. De acordo com o banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes – COUTINHO & HENRISSAT, 1999, <http://www.cazy.org>), as quitinases podem ser distribuídas nas famílias 18, 19 e 20 das glicosil-hidrolases (EC 3.2.1.-). As quitinases da Família 18 são aquelas descritas em bactéria, fungos filamentosos, leveduras, vírus, plantas e animais, enquanto os membros da Família 19 são quase exclusivamente de origem vegetal. A comparação entre quitinases da Família 18 com aquelas da Família 19 revela a completa falta de similaridade entre elas, tanto na seqüência primária de aminoácidos quanto na estrutura tridimensional predita, o que sugere uma divergência na sua origem evolutiva. A Família 20, por sua vez, é composta por β -N-acetilglicosaminidases (HENRISSAT, 1999).

Pode ainda ser considerada, de acordo com a seqüência primária da quitinase, a classificação em subfamílias, classes ou grupos. As quitinases de origem bacteriana são separadas em três subfamílias: A, B e C. Já as de origem vegetal se enquadram em cinco classes: I – V. As quitinases de fungos, sendo a grande maioria pertencente à Família 18, podem ser classificadas em dois grupos: bactéria/fungo, similar a quitinases de origem bacteriana e correspondente à classe V; e planta/fungo, com maior similaridade às de origem vegetal e correspondente à classe III (HENRISSAT, 1999, DUO-CHUAN, 2006).

Estudos cristalográficos de quitinases da família 18 oriundas de fungos têm sido realizados com o intuito da elucidação estrutural e do desenho racional de fármacos. Três quitinases de fungos pertencentes à família 18 tiveram sua estrutura descrita: a quitinase CiX1 do fungo *Coccidioides immitis* (HOLLIS ET AL., 2000), a quitinase AfChiB1 do fungo *Aspergillus fumigatus* (RAO ET AL., 2005) e a quitinase ScCTS1 da levedura *Saccharomyces*

cerevisae (HURTADO-GUERRERO & VAN AALTEN, 2007). As três estruturas apresentam uma geometria similar, sendo caracterizadas por estrutura de barril formada por oito α -hélices e oito fitas β -pregueadas ($\beta\alpha$)₈ que se alternam (Figura 1.5). O sítio catalítico da quitinase AfChib1 de *A. fumigatus* é composto por dois resíduos presentes no final da fita β 4, Aspartato 175 e Glutamato 177, correspondente ao motivo consenso DxEx (RAO ET AL., 2005). Já os resíduos de Aspartato 169 e Glutamato 171 são os correspondentes da quitinase CiX1 de *C. immitis* (HOLLIS ET AL., 2000). Outro fato em comum referente as duas quitinases supracitadas, AfChib1 e CiX1, se refere à classificação no grupo bactéria/fungo (Classe V). A quitinase ScCTS1 de *S. cerevisae*, por sua vez, é classificada como planta/fungo (Classe III). As maiores diferenças encontradas entre as estruturas de quitinases da Classe III em relação às quitinases da Classe V, aqui representadas pelas quitinases AfChib1 e ScCTS1, respectivamente, se referem ao sítio catalítico. Enquanto a quitinase AfChib1 apresenta um sítio catalítico presente em sulcos profundos, o sítio catalítico da quitinase ScCTS1 está presente em um sulco raso (HURTADO-GUERRERO & VAN AALTEN, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados com quitinases de fungos filamentosos e a análise no GenBank mostra mais de 450 seqüências nucleotídicas para esta classe de enzimas. Devido à grande complexidade deste sistema, serão tratados aqui os sistemas quitinolíticos melhor caracterizados em fungos filamentosos, aqueles das espécies do micoparasita *Trichoderma*, além dos relatos até então obtidos para o fungo *M. anisopliae*, assim como para o entomopatógeno *Beauveria bassiana*, como um modelo comparativo.

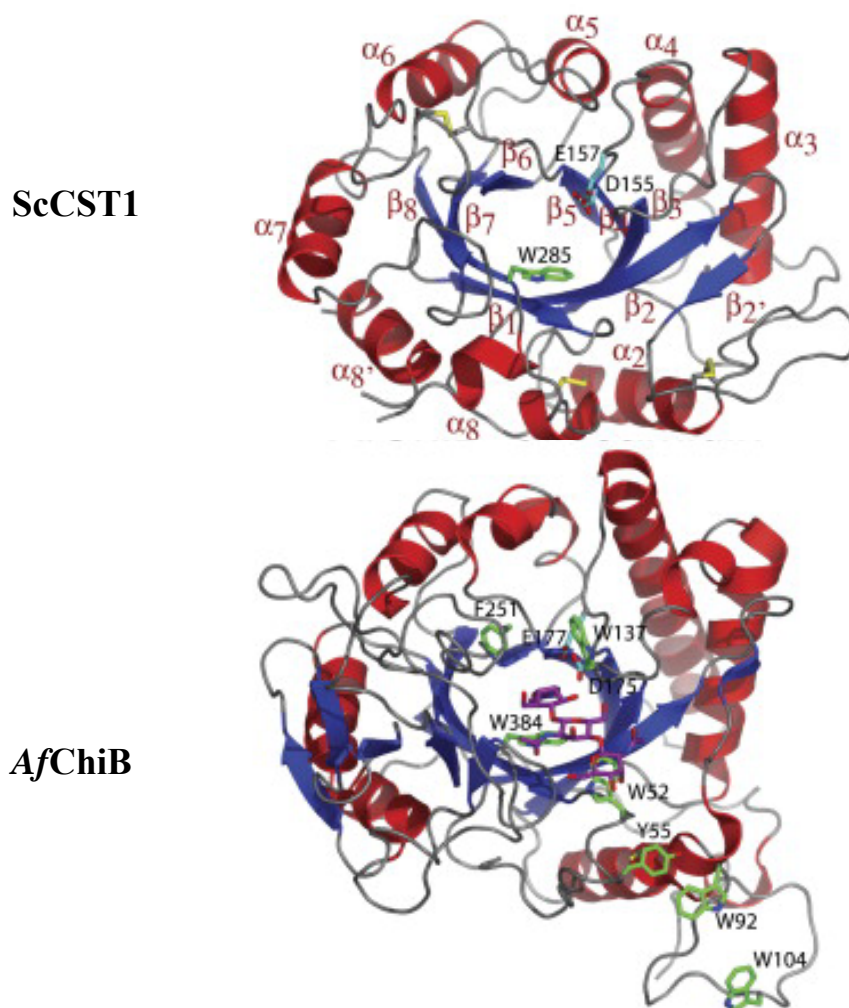


Figura 1.5: Estrutura cristalográfica das quitinases ScCST1 e Af ChiB1 de *S. cerevisiae* e *A. fumigatus*, respectivamente. Estrutura em forma de barril evidenciada por oito α -hélices (em vermelho) e oito folhas β -pregueadas (em azul) dispostas alternadamente. Adaptado de HURTADO-GUERRERO & VAN AALTEN, 2007. Os aminoácidos aromáticos (verde) e a o sitio ativos (ciano) estão marcados.

Os sistemas quitinolíticos de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma atroviride*, foram recentemente elucidados e apresentam cada um, 18 genes de quitinases, todos pertencentes à Família 18 das Glicosil-hidrolases (Tabela 1.2). A maioria apresenta em sua seqüência primária de aminoácidos, seqüências consenso de peptídeo sinal, o que sugere sua secreção para o meio extracelular. As quitinases de fungos filamentosos têm sua expressão geralmente

regulada pela disponibilidade de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como a glicose e outros açúcares, cuja disponibilidade reprime a sua expressão. Quando o substrato é a quitina ou seus produtos de degradação, ocorre a ativação da sua expressão. A lógica deste sistema é que a quitina insolúvel no ambiente externo da célula é detectada por pequenas quantidades dos produtos da sua degradação. Isso sinaliza para a célula que quitinases devem ser expressas e transportadas para o meio exterior para degradar o substrato polimérico. De forma inversa, nutrientes mais facilmente utilizáveis, a partir de uma determinada concentração, inibem todo o sistema como forma de aperfeiçoar o gasto energético. Entretanto, nem todas as quitinases obedecem a este padrão de regulação, por exemplo, algumas das quitinases clonadas neste estudo são igualmente expressas em condições de indução ou repressão. Além disso, ocorre expressão da maioria das quitinases em privação de nutrientes e em condições de micoparasitismo (SEIDL *ET AL.*, 2005).

Estudos anteriores mostram um complexo quitinolítico de *Trichoderma* com função principalmente voltada ao micoparasitismo. A quitinase codificada pelo gene *ech42*, foi um dos primeiros fatores de virulência descritos para o gênero *Trichoderma*. Linhagens transgênicas contendo cópias múltiplas deste gene foram construídas e foi demonstrado que a atividade extracelular de quitinases aumentou até 42 vezes, com conseqüente aumento de virulência contra o fungo *Rhizoctonia solani*, ao passo que não houve diferenças quando o hospedeiro era o fungo *Sclerotium rolfsii*. Entretanto, mutantes nulos deste gene, apesar de apresentar atividade quitinolítica extracelular 10 vezes menor em relação à linhagem selvagem, não apresentaram diferenças de virulência aos mesmos hospedeiros (CARSOLIO *ET AL.*, 1999). Estudos posteriores evidenciaram um padrão complexo de expressão do gene *ech42*, sendo que a ativação ocorre pela adição de quitina ao meio de cultivo, por privação de nutrientes ou condições de estresse, tanto térmico (apenas por frio) quanto osmótico (MACH *ET AL.*, 1999).

Tabela 1.2: Quitinases de *Trichoderma reesei*. Os genes encontrados por análise do genoma deste fungo foram nomeados de acordo com a ordem crescente do pI da proteína predita. A localização é designada conforme algoritmo SignalP. Adaptado de SEIDL *ET AL.*, 2005.

Gene	Massa predita (kDa)	Localização	Genes ortólogos previamente clonados ⁺	Classe [§]
<i>Chi18-1</i>	146,5	Extracelular	-	N
<i>Chi18-2</i>	44,5	Citoplasmática	-	V
<i>Chi18-3</i>	38,7	Mitocondrial	-	V
<i>Chi18-4</i>	44,2	RE*	-	V
<i>Chi18-5</i>	46	Extracelular	Ech42, Tv-Ech1	V
<i>Chi18-6</i>	54,2	Extracelular	Tv-Ech3	V
<i>Chi18-7</i>	44,6	Citoplasmática	Tv-ech2	V
<i>Chi18-8</i>	139,1	Extracelular	-	N
<i>Chi18-9</i>	163,1	Extracelular	-	N
<i>Chi18-10</i>	136,1	Extracelular	-	N
<i>Chi18-11</i>	41,5	Extracelular	-	V
<i>Chi18-12</i>	35	Extracelular	Chit33, Tv-Cht1	III
<i>Chi18-13</i>	41	Extracelular	Ech30	III
<i>Chi18-14</i>	42,6	Extracelular	-	III
<i>Chi18-15</i>	36,2	Extracelular	Chit36	-
<i>Chi18-16</i>	41,9	Extracelular	-	III
<i>Chi18-17</i>	41,4	Extracelular	Tv-Cht2	III
<i>Chi18-18</i>	104,2	Extracelular	-	V

*RE, retículo endoplasmático.

+ A presença do sinal (–) indica a inexistência de genes ortólogos previamente clonados.

§ Classe V, bactéria/fungo; Classe III, planta/fungo; Classe N, nova

O gene *chit33* produz uma quitinase com massa de 33 kDa em *T. harzianum* (LIMÓN ET AL., 1995). Este gene, quando expresso constitutivamente, aumenta em cerca de 200 vezes a atividade extracelular de quitinases em relação à linhagem selvagem, quando cultivados em meio não indutor (glicose). Quando cultivados em meio indutor de quitinases (quitina), tanto a linhagem selvagem quanto os transformantes, secretam quantidades similares de quitinases. As linhagens transformantes, por sua vez, possuem maior virulência para o fungo *R. solani* (LIMÓN ET AL., 1999). Este gene possui um complexo sistema de regulação, sendo sua transcrição ativada por metabólitos como quitina, NAG e parede celular de *R. solani*, ao passo que glicose e glicerol inibem sua transcrição. Assim como o caso do gene *ech42*, este gene é mais expresso em condições de estresse térmico, entretanto sua ativação se dá também por temperaturas altas (DANA ET AL., 2001).

O gene *Ech30*, de uma quitinase com massa de 30 kDa em *T. atroviride*, foi clonado e o seu perfil de expressão avaliado, sendo que quitina não induz a sua expressão, ao passo que glicose e ensaios de confronto com *Botrytis cinerea* são indutores (KLEMSDAL ET AL., 2006).

Outro gene de uma quitinase de *T. reesei*, com massa de 46 kDa (gene *chi46*), foi recentemente clonado e a seqüência de aminoácidos da proteína foi determinada a partir da purificação da enzima proveniente de cultivos em NAG. O padrão de expressão foi avaliado em presença de glicose e NAG sendo demonstrado que este gene segue o padrão de indução/repressão típico de genes de quitinases. Entretanto apresentou periodicidade na expressão em relação ao tempo de incubação (12 – 72 H), o que sugere um complexo sistema de regulação da expressão deste gene (IKE ET AL., 2006).

A regulação da atividade quitinolítica secretada por *T. atroviride* se dá, em parte, pela enzima N-acetilglicosaminidase codificada pelo gene *NagI*. Trata-se de uma enzima

extracelular parcialmente ligada à parede celular que, dependendo dos níveis extracelulares de quitobiase e NAG, regula a ativação da expressão de quitinases, pois mutantes nulos do gene *Nag1* não apresentam aumento da transcrição do gene *ech42* em condições normais de indução. Além disso, a atividade de quitinase em sobrenadantes de cultivos induzidos para a produção de quitinases diminuiu até 80 vezes (BRUNNER *ET AL.*, 2003). O próprio gene *Nag1* tem sua expressão modulada por sinais típicos da regulação de quitinases, sendo induzido por quitina e oligômeros de NAG (MACH *ET AL.*, 1999). Em conclusão, o sistema quitinolítico das espécies de *Trichoderma* apresenta um controle de expressão bastante específico e com uma complexidade não prevista devendo ainda ser mais bem detalhado.

As quitinases secretadas pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana* também podem representar um dos fatores de patogenicidade atuando na hidrólise da cutícula de seus hospedeiros. O estudo das quitinases de *B. bassiana* é recente. A partir de cultivos em quitina coloidal, foi purificada a endoquitinase Bbchi1 produzida por *B. bassiana*. Com base no seu seqüenciamento amino-terminal, foi clonado o gene *Bbchi1*. Linhagens transgênicas com expressão constitutiva desta quitinase apresentaram um aumento de até 20 vezes na atividade quitinolítica extracelular, comparada à linhagem selvagem. Bioensaios realizados em afídeos *Myzus persicae* mostraram também o aumento da virulência dos transgênicos em comparação ao tipo selvagem, demonstrando a participação da quitinase Bbchi1 na virulência de *B. bassiana* (FANG *ET AL.*, 2005). Estudos posteriores com este gene mostraram que a adição de um motivo de ligação a carboidratos, proveniente de uma quitinase do bicho da seda (*Bombyx mori*), é capaz de aumentar ainda mais a virulência dos transgênicos tanto em relação aqueles com expressão constitutiva da quitinase selvagem quanto aquela da linhagem selvagem (FAN *ET AL.*, 2007).

As quitinases de *M. anisopliae* começaram a ser estudadas uma vez que a quitina é um dos componentes mais importantes na atribuição da rigidez da cutícula dos artrópodes, que é a principal barreira a infecção. A primeira descrição de quitinases em *M. anisopliae* ocorreu em 1987, quando foi detectada a atividade de quitinases em sobrenadantes de culturas adicionados de cutículas de gafanhoto como fonte de nutrição (ST. LEGER *ET AL.*, 1987). Posteriormente, utilizando quitina como substrato único em meios de cultivos, o mesmo grupo de pesquisa foi capaz de purificar e caracterizar duas quitinases com massas de 33 e 110 kDa, com atividades de endoquitinase e quitobiase, respectivamente (ST. LEGER *ET AL.*, 1991). Utilizando análise por zimogramas associada à isoeletrofocalização, foi revelada a secreção de diversas isoformas de quitinases com pI ácido em meios de cultivo suplementados com cutícula de barata, sendo majoritária uma proteína de 43,5 kDa, cujo seqüenciamento aminoterminal revelou alta identidade com a quitinase de 42 kDa de *T. harzianum*. Anticorpos produzidos contra esta proteína foram capazes de detectar a presença desta proteína em etapas tardias da penetração em insetos, posterior à secreção de proteases (ST. LEGER *ET AL.*, 1996b).

O gene desta quitinase foi posteriormente clonado pelo nosso grupo, sendo denominado *chit1*. Este gene apresenta três pequenos íntrons e uma ORF de 1.521 pb, que codifica uma proteína de 423 aminoácidos, tendo os 35 primeiros aminoácidos características de peptídeo-sinal. A proteína madura apresenta massa molecular de 42 kDa e pI de 5,8. (BOGO *ET AL.*, 1998). Análises da proteína recombinante, expressa em *E. coli*, revelaram se tratar de uma endoquitinase (BARATTO *ET AL.*, 2003). A avaliação da função do gene *chit1* foi realizada posteriormente com a obtenção de transformantes contendo cassetes para a expressão constitutiva deste gene. A atividade extracelular de quitinase aumentou cerca de duas vezes em meio indutor e cerca de 140 vezes em meio não indutor comparando com a linhagem selvagem. Ocorreu também um aumento da expressão da atividade de quitinases em

um tempo menor de cultivo em meio indutor em relação ao tipo selvagem. Entretanto, não foram detectadas alterações de virulência utilizando como modelo a larva de *M. sexta* (SCREEN & ST. LEGER, 2001). A sua função no processo de infecção ainda é incerta.

Recentemente foi descrita a clonagem e a caracterização do gene *chi2*, que possui uma seqüência codificante de 1.542 pb interrompida por 2 íntrons e codifica uma quitinase com massa molecular e pI preditos de 42 kDa e 4,8, respectivamente. A expressão deste gene é regulada positivamente por quitina, cutícula do carrapato *B. microplus* ou NAG adicionado ao meio de cultivo, ao passo que glicose regula negativamente (BARATTO *ET AL.*, 2006).

A quitinase CHIT30, uma proteína com massa de 30 kDa, foi a primeira enzima desta classe a ser purificada a exibir ambas as atividades de endo e de exoquitinase (PINTO *ET AL.*, 1997). Anticorpos produzidos contra esta enzima levaram a clonagem da seqüência parcial do cDNA deste gene a partir de uma biblioteca de expressão. Os anticorpos foram utilizados em experimentos de *Western blot*, cuja análise revelou que a expressão deste gene segue o padrão do gene *chi2*, ou seja, a expressão é induzida por quitina, cutícula de *B. microplus* ou NAG adicionados ao meio de cultivo, ao passo que a glicose a reprime. Ensaio de imunohistoquímica revelaram a presença desta quitinase durante o processo de infecção do carrapato *B. microplus* (SILVA *ET AL.*, 2005).

De modo geral a regulação da expressão de quitinases em *M. anisopliae*, tanto aquelas secretadas quanto as presentes em preparações de parede celular, é mediada por um sistema de indução repressão, no qual quitina, cutícula de diversos hospedeiros, quantidades pequenas (0,1 – 0,5%) de NAG induzem a expressão de quitinases no meio extracelular. Contrariamente, glicose, concentrações de NAG mais elevadas (1%) e o aminoácido alanina regulam negativamente a expressão de quitinases por repressão catabólica (BARRETO *ET AL.*, 2004; MORAES *ET AL.*, 2003; SILVA *ET AL.*, 2005).

2.5. ATRIBUIÇÃO DE FUNÇÃO GÊNICA EM FUNGOS FILAMENTOSOS POR AGRO-TRANSFORMAÇÃO

Desde a demonstração da capacidade da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* em transferir o T-DNA presente em um plasmídeo binário para células de levedura (BUNDOCK *ET AL.*, 1995) e posteriormente para alguns fungos filamentosos (DE GROOT *ET AL.*, 1998), dezenas de espécies de fungos filamentosos foram transformados por Agro-transformação (MICHELSE *ET AL.*, 2005a). A Agro-transformação em fungos filamentosos tem sido utilizada na atribuição da função de genes por três maneiras: (i) a inativação gênica por recombinação homóloga (nockout); (ii) o silenciamento gênico por RNAi, ambos específicos para uma seqüência de um gene conhecido ou (iii) criação de uma biblioteca de inserção, com conseqüente análise de fenótipos e posterior isolamento das seqüências flanqueadoras do T-DNA inserido no genoma do fungo (WELD *ET AL.*, 2006).

O mecanismo pelo qual a bactéria Gram negativa *A. tumefaciens* transforma geneticamente uma diversidade de fungos (Ascomicetos, Basidiomicetos, Zigomicetos e Oomicetos) tem as mesmas bases pelo qual esta bactéria causa tumores em plantas e transforma espécies vegetais (MICHELSE *ET AL.*, 2005a).

As células de *A. tumefaciens* utilizadas em experimentos de transformação genética possuem um plasmídeo Ti que contém a grande maioria dos genes necessários para a transformação. Os genes *vir* estão diretamente associados ao processo de transferência do T-DNA e a sua localização é no plasmídeo Ti. As células de *A. tumefaciens* possuem ainda um vetor binário, o qual contém o T-DNA, fragmento de DNA a ser transferido. O T-DNA é caracterizado pela presença de duas regiões repetitivas com um tamanho de cerca de 300 pb, localizadas nas extremidades do mesmo. Elas são denominadas como Bordas Direita (BD) e Esquerda (BE). Estas seqüências são responsáveis pelo reconhecimento e processamento por

parte da maquinaria protéica envolvida na transferência do DNA (MICHIELSE *ET AL.*, 2005a).

Em contato com compostos fenólicos, em especial o hormônio vegetal acetoseringona, as proteínas VirA e VirG, componentes de um sistema regulatório de transdução de sinais, são ativadas. A proteína VirA, localizada na membrana interna, está associada com a proteína ChvE e, ao interagir com a acetoseringona, se autofosforila e resulta na fosforilação da proteína VirG. Esta, estando ativada por fosforilação, atua como ativador da transcrição da região *vir* localizada no plasmídeo Ti, levando ao aumento da expressão dos genes *virABCDEFGH* (MICHIELSE *ET AL.*, 2005a).

Os produtos dos genes *virD1* e *virD2* atuam de forma direta no processamento do T-DNA. São as endonucleases que o hidrolisam o plasmídeo binário nas BE e BD, guiadas pela ligação da proteína VirC1 a uma seqüência específica localizada junto à BD. Com a hidrólise, estas proteínas permanecem covalentemente ligadas ao T-DNA. Após a hidrólise, diversas unidades da proteína VirE2, a qual possui um domínio de ligação ao DNA, se associam ao T-DNA, formando o complexo T. Esta associação ocorre com dois propósitos: a proteção do T-DNA, evitando a degradação por nucleases, e a manutenção da conformação linear, que auxiliaria no transporte do T-DNA até o núcleo da célula que será transformada. O primeiro poro pelo qual o complexo T transita é o T pillus que é classificado com um sistema de secreção bacteriano do tipo IV. Este poro é formado basicamente pelas proteínas VirB1-11 e VirD4. Os detalhes da associação entre a extremidade distal do T pillus e a célula hospedeira ainda são desconhecidos. Uma vez no citoplasma, o complexo T transita até o núcleo através do Complexo de Poro Nuclear com o auxílio de importinas, as quais interagem com o sinal de localização nuclear presente na proteína VirD2. Uma vez no núcleo, proteínas do hospedeiro

são responsáveis pela integração do T-DNA, por recombinação homóloga ou *non homologous end joining* (NHEJ), ao genoma do hospedeiro (Figura 1.6, MICHIELSE *ET AL.*, 2005a).

Um dos trabalhos pioneiros utilizando a Agro-transformação para promover a inativação gênica em fungos filamentosos foi realizado no fungo *Mycosphaerella graminicola* com eficiência de recombinação homóloga de 44% (ZWIERS & DE WARD, 2001). Em geral a construção para a inativação contém uma marca de seleção flanqueada, nas duas extremidades, por fragmentos do gene alvo da inativação.

A melhor caracterização da Agro-transformação como método de construção de mutantes nulos foi apresentada em um trabalho em *Aspergillus awamori*, no qual a inativação do gene *pyrG*, envolvido no anabolismo de nucleotídeos, foi aumentada em média 3 vezes quando realizada por Agro-transformação em relação ao tratamento químico de esferoplastos. O aumento da extensão das seqüências homólogas do gene alvo acarretou em maior eficiência de recombinação homóloga. Para diminuição do número de transformantes a ser analisados, os autores propuseram a utilização de um sistema de seleção positivo negativo. A seleção positiva se dava primeiramente pela resistência à higromicina, cujo gene que conferia este fenótipo estava presente no cassete de inativação. A adição de uma segunda marca de seleção (o gene *amdS*) flanqueando o cassete de inativação permitia a seleção negativa dos transformantes, ou seja, transformantes contendo o fenótipo codificado pelo gene *amdS* (a utilização de acetamida com única fonte de carbono em meio de cultura) eram provenientes de eventos de recombinação em sítio não homólogo do cassete de inativação. Estes transformantes não eram utilizados na procura por transformantes com integração no sítio homólogo do cassete de inativação. Utilizando esta estratégia, houve um enriquecimento de possíveis mutantes nocaute, com um aumento da frequência de recombinação homóloga para 28 a 55% (MICHIELSE *ET AL.*, 2005b). A metodologia de seleção negativa, com o intuito de

aumentar o número de transformantes com integração homóloga do cassete de inativação, foi utilizada também nos fungos *Leptosphaeria maculans* (GARDINER & HOWLETT, 2004), *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum* (KHANG ET AL., 2005) e *M. anisopliae* (FANG ET AL., 2007).

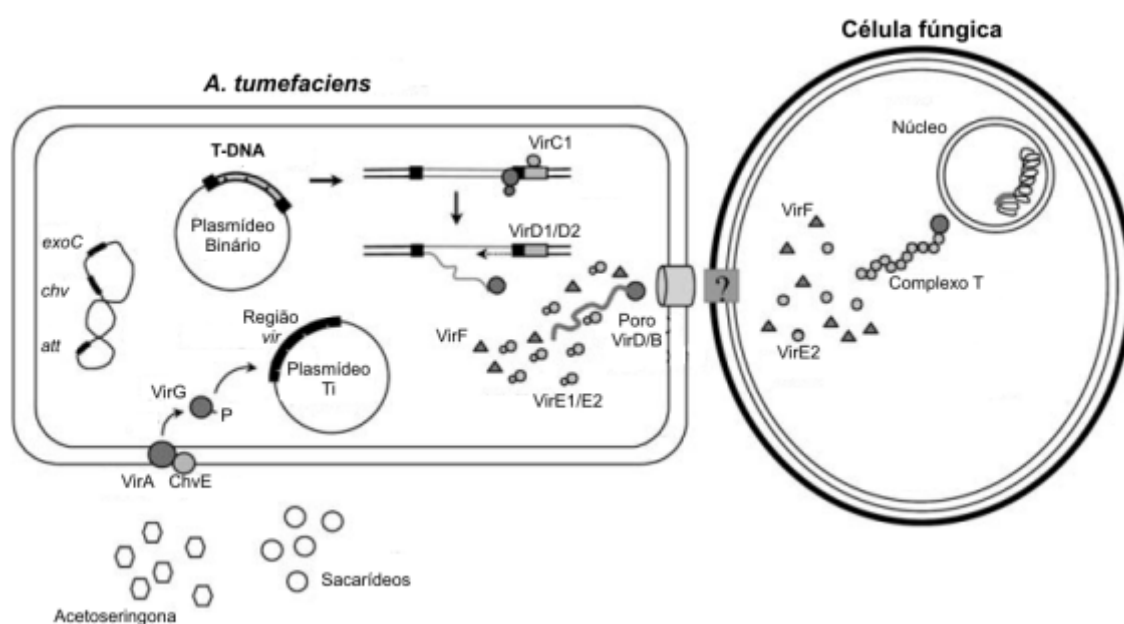


Figura 1.6: Representação do processo de transferência de material genético entre *Agrobacterium* e a célula fúngica. Adaptado de MICHIELSE e colaboradores (2005a).

A inativação por silenciamento gênico por RNAi (RNA de interferência) também foi aplicada em fungos filamentosos por Agro-transformação. O primeiro relato foi do silenciamento simultâneo de dois genes no fungo *Venturia inaequalis*, o transgene repórter sGFP e o gene TNH, envolvido na síntese de melanina, com diminuição de até 90% dos transcritos destes genes em 50% dos transformantes obtidos (FITZGERALD ET AL., 2004). O silenciamento gênico obtido por Agro-transformação também foi utilizado em *Ophiostoma piceae* e *Ophiostoma floccosum* (TANGUAY ET AL., 2006) e nos fungos dimórficos *Blastomyces dermatitidis* (NEMECEK ET AL., 2006) e *Histoplasma capsulatum* (MARION ET AL., 2006).

Devido ao modo pelo qual o T-DNA é inserido no genoma da maioria dos fungos nos quais foi testada a Agro-transformação, por recombinação não homóloga e em cópia única, esta metodologia se tornou atrativa para a construção de bibliotecas de mutantes por mutagênese insercional (WELD *ET AL.*, 2006). O primeiro relato de aplicação da Agro-transformação para construção de bibliotecas de mutantes de inserção foi na levedura *S. cerevisiae*, para a qual foi descrito o padrão de inserção do T-DNA em 54 transformantes de uma pequena biblioteca construída contendo 70 transformantes. A inserção ocorreu sem preferência por seqüências nucleotídicas específicas ou regiões cromossômicas. Além do mais, foram isolados 13 diferentes transformantes cada uma contendo uma inserção em um diferente gene. O nocaute ou inativação destes 13 genes não levou a alterações fenotípicas durante o cultivo em meio mínimo das linhagens analisadas em sua forma haplóide (BUNDOCK *ET AL.*, 2002).

Na levedura patogênica para humanos *Cryptococcus neoformans*, um banco contendo 12.000 mutantes foi gerado por Agro-transformação. O banco foi analisado em relação à capacidade de produção de melanina, um fator de virulência, tendo sido detectados 19 mutantes. O seqüenciamento das regiões adjacentes ao sítio de integração do cassete de inativação no genoma destes mutantes revelou o envolvimento de cinco novos genes na síntese de melanina neste fungo (WALTON *ET AL.*, 2005).

Em fungos filamentosos, recentemente, foram descritos ensaios para o isolamento de genes com base na construção de bibliotecas de inserção por Agro-transformação. No fungo fitopatígeno *Phialophora gregata*, uma biblioteca de cerca de 400 mutantes foi construída, sendo que um destes mutantes apresentou virulência diminuída e quatro apresentaram deficiência na produção da toxina gregatina (TANAKA *ET AL.*, 2007). Para outro fitopatígeno, *Ascochyta rabiei*, também foi construída uma biblioteca de inserção da qual

foram isolados oito mutantes com virulência diminuída em relação à linhagem selvagem (WHITE & CHEN, 2007).

Os projetos mais completos de construção de bibliotecas de inserção estão concentrados no fungo fitopatôgeno *Magnaporthe oryzae*, para o qual foi gerada uma biblioteca de mais de 20.000 mutantes, nos quais foram analisadas as seguintes alterações fenotípicas: conidiação, desenvolvimento vegetativo, virulência, formação de apressório e penetração na superfície. Foi atribuída a função a uma diversidade de novos genes, sendo 202 ligados à virulência (JEON *ET AL.*, 2007). Outro estudo paralelo também realizado em *M. grisea* relatou a construção de 55.000 transformantes e a análise das alterações fenotípicas seguia basicamente os mesmos critérios do trabalho anterior (BETTS *ET AL.*, 2007).

A geração sistemática de mutantes em fungos filamentosos mediada pela Agro-transformação, especialmente na era pós-genômica, oferece a possibilidade do estudo e caracterização de genes nestes organismos de uma maneira muito mais rápida e massiva em relação às metodologias utilizadas durante a consolidação de estudo de biologia molecular em fungos. A aplicação do seqüenciamento de genomas de fungos, associado a estudos de proteômica e avaliação do programa de expressão gênica em diversas condições fisiológicas permite a rápida clonagem de genes de interesse com posteriores estudo da geração e mutantes nocaute destes genes para avaliar sua função. Por outro lado, a construção de bibliotecas de mutantes de inserção permite o isolamento de genes especificamente envolvidos em um determinado fenótipo.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho integra a linha de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos cujo objetivo é descrever a função de determinantes de patogenicidade envolvidos na interação entre o fungo *Metarhizium anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes.

Um dos aspectos abordados nesta linha de pesquisa é o estudo do sistema de degradação de quitina, que participa de pelo menos duas atividades importantes na Biologia de *Metarhizium anisopliae*, como de outros fungos: (i) no remodelamento da parede celular, sítio de intensa deposição de quitina, propiciando o crescimento celular pela extensão das hifas, a liberação de conídeos e a diferenciação celular e (ii) na nutrição, pela hidrólise de quitina exógena, por exemplo como componente da cutícula dos seus hospedeiros. Ambas as atividades são necessárias para a infecção dos hospedeiros artrópodes.

Nesta Tese, foi focado um dos genes que codificam quitinases em *M. anisopliae*, o gene *chi3*, que codifica uma quitinase de 30 kDa (CHIT30), no sentido de caracterizar a sua função. Para tal objetivamos: (i) caracterizar o gene *chi3* pela clonagem, seqüenciamento e análise, visando identificar possíveis regiões regulatórias; (ii) analisar a expressão dos seus transcritos durante o ciclo de vida do fungo e durante o processo de infecção em hospedeiros artrópodes e (iii) identificar a sua função pela construção de mutantes insercionais por inativação do gene *chi3* e análise de seu fenótipo verificando a localização celular da quitinase CHIT30 pela fusão do gene com a proteína repórter GFP.

Para concretizar esses objetivos algumas ferramentas foram desenvolvidas. Para proceder à construção de mutantes insercionais, foi desenvolvida uma metodologia de Agro-transformação para *M. anisopliae* visando obter um protocolo eficiente e reproduzível para a geração de mutantes insercionais para a inativação de genes alvo. Esta metodologia poderá

ainda ter aplicação na construção de bancos de mutantes funcionais de *M. anisopliae* pela inativação de genes por inserção aleatória de marcas de seleção, permitindo identificar a função gênica.

3.1. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

A apresentação desta Tese foi organizada a em dois Módulos, a saber,

3.1.1. MÓDULO I: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO GÊNICA

- Desenvolvimento de um sistema para a geração de mutantes nulos por Agro-transformação utilizando um dos genes da via anabólica do triptofano (gene *trp1*) para validar a metodologia;
- Caracterização bioquímica e molecular dos mutantes *trp1*;
- Complementação genética dos mutantes nulos com o gene *trp1* selvagem para avaliar a possível utilização deste gene e do mutante como sistema de seleção de transformantes.
- Construção de uma biblioteca de mutantes por inserção por Agro-transformação;
- Avaliação da aplicabilidade desta metodologia de isolamento de genes pela análise morfológica dos transformantes;

3.1.2. MÓDULO II: CARACTERIZAÇÃO DO GENE *CHI3* DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

- Clonagem do gene *chi3* a partir de uma seqüência de cDNA e determinação da sua seqüência;
- Identificação de possíveis seqüências envolvidas no controle da expressão do gene *chi3* a partir da análise *in silico* da região flanqueadora 5' do gene;
- Utilização do sistema de inativação gênica desenvolvido para construir mutantes nulos para o gene *chi3*;
- Caracterização bioquímica e molecular dos mutantes nulos do gene *chi3*;
- Construção de linhagens expressando uma versão fusionada do gene *chi3* com o gene repórter *gfp* e caracterização molecular;

4. MÓDULO I: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO GÊNICA EM *M. ANISOPLIAE*

4.1. INTRODUÇÃO

A atribuição da função gênica no fungo *M. anisopliae* foi iniciada apenas recentemente, apesar do desenvolvimento de sistemas de transformação há mais de uma década (BOGO *ET AL.*, 1996). Somente nos dois últimos anos, houve um crescente número de publicações descrevendo a inativação gênica em *M. anisopliae* por recombinação homóloga (ver Tabela 1.1 – Revisão Bibliográfica).

A utilização da Agro-transformação em estudos da funcionalidade de genes em *M. anisopliae* foi descrita recentemente. Em nosso trabalho, descrevemos a utilização da Agro-transformação para o nocaute de um gene que codifica para uma enzima envolvida no anabolismo do triptofano, o gene *trp1*. Pudemos obter uma frequência de recombinação homóloga da ordem de 20% (STAATS *ET AL.*, 2007). No mesmo ano, FANG e colaboradores (2007), utilizaram a Agro-transformação para construir mutantes nocautes do gene *cag8*, que codifica um regulador da sinalização celular por Proteínas G. Para tal, a metodologia utilizada fazia uso de um enriquecimento de possíveis nocautes pelo emprego de uma segunda marca de seleção, um cassete de expressão da proteína fluorescente GFP. Desta forma, foram somente analisados aqueles transformantes que não apresentavam fluorescência verde quando examinados ao microscópio de fluorescência (FANG *ET AL.*, 2007).

A primeira parte deste módulo descreve o desenvolvimento propriamente dito de um sistema para a geração de mutantes nulos no fungo *M. anisopliae*. Para tal, foi inserida a publicação no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*, sendo intitulada “Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium*

anisopliae.” Participamos também, como colaboradores, na descrição de um protocolo de Agro-transformação em *M. anisopliae* (DUARTE ET AL., 2007 – Anexo II)

A segunda estratégia abordada neste módulo trata da construção de uma biblioteca de mutantes do fungo por inserção aleatória do T-DNA, assim como a caracterização molecular parcial de alguns transformantes com alterações morfológicas diferenciadas em relação à linhagem selvagem.

4.2. ARTIGO “Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*”

Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*

Charley Christian Staats · Angela Junges ·
Mariana Fitarelli · Marcia Cristina Furlaneto ·
Marilene Henning Vainstein · Augusto Schrank

Received: 3 January 2007 / Revised: 3 May 2007 / Accepted: 23 May 2007 / Published online: 3 July 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The list of fungal species with known complete genome and/or expressed sequence tag collections is extending rapidly during the last couple of years. Post-genomic gene function assignment is an obvious follow-up and depends on methodologies to test gene function in vivo. One of such methods is the generation of null mutants via homologous recombination at the wild-type loci by using inactivation cassettes. In this paper, the ability of *Agrobacterium tumefaciens* to genetically transform filamentous fungi was exploited to drive homologous recombination at the *trp1* locus of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. The *trp1* disruptants exhibited a clearly distinguishable phenotype from wild-type cells and were recovered with high efficiency of homologous recombination (22%). The complementation of such

mutants with the wild-type gene generates only transformants with homologous integration.

Keywords *Metarhizium* · Agrotransformation · Gene inactivation · Entomopathogen

Introduction

The massive sequencing of genomes from filamentous fungi, including the model systems *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, the phytopathogens *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora sojae*, and *Phytophthora ramorum*, and the human pathogen *Aspergillus fumigatus*, broadens the possibilities of a better understanding of complex physiologic systems by gene function assignment. The usual methods to disclose gene function in a given context consist of gene tagging, overexpression, and inactivation (Weld et al. 2006). Gene inactivation in filamentous fungi is generally accomplished by flanking a selectable marker with sequences of a target gene. The overall efficiency of the process depends upon several factors, including the length of the flanking sequences, the G+C content, the genetic background of the recipient fungi, the transcriptional status of the target gene, and the local chromatin structure of the gene determined by its chromosomal localization (Bird and Bradshaw 1997; Michielse et al. 2005a, b).

The transformation based upon the deoxyribonucleic acid (DNA) transfer capability of *Agrobacterium tumefaciens* has been utilized in filamentous fungi for almost a decade (de Groot et al. 1998), and several species were described to be efficiently transformable (for a review, see Michielse et al. 2005b). Compared to DNA-mediated transformation protocols, *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) renders higher efficiencies of transforma-

C. C. Staats · A. Junges · M. Fitarelli · M. H. Vainstein ·
A. Schrank (✉)
Centro de Biotecnologia,
Programa de Pós-graduação em Biologia celular e Molecular,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: aschrank@cbiot.ufrgs.br

M. C. Furlaneto
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Londrina,
Porto Alegre, RS, Brazil

M. H. Vainstein
Departamento de Microbiologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

A. Schrank
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

tion and improves gene targeting with integration of the transfer DNA (T-DNA) into the genome generally occurring as a single copy. The efficacy of ATMT in fungi depends upon several factors, including fungal cell type and density, the *A. tumefaciens* strain, the ratio of bacterial to fungal cells, the initial number of bacteria added to cocultivation, the time and temperature of cocultivation, and the concentration of the inducer (acetoseryngone) during cocultivation (Combiere et al. 2003; Fang et al. 2004; Godio et al. 2004; Lima et al. 2006; Meyer et al. 2003).

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the best characterized entomopathogens and parasitizes more than 300 species of insects, including vectors of human diseases, such as *Anopheles gambiae* (Scholte et al. 2006) and *Triatoma infestans* (Lazzarini et al. 2006). Its pathogenicity was also demonstrated to several agricultural pests (Arruda et al. 2005; Kassa et al. 2004). Because of its potential as a biocontrol agent, programs of massive isolation of differentially expressed genes (Dutra et al. 2004), sequencing of expressed sequence tags (Freimoser et al. 2003), and microarray analysis (Wang et al. 2005) were conducted to characterize genes involved in the infection process.

With the aim of generating null mutants of selected genes demonstrated to be differentially expressed during the infection process, we set up an *A. tumefaciens*-mediated gene replacement system for *M. anisopliae*. The selection is based on an ammonium glufosinate resistance expression cassette used to knockout the tryptophan anabolic *trp1* gene as a target. High efficiency of homologous recombination was achieved, and mutants were shown to express a truncated *trp1* gene transcript. Genetic complementation by the wild-type *trp1* gene allowed us to isolate prototrophic transformants from the mutant strains.

Materials and methods

Strains and culture medium

M. anisopliae var. *anisopliae* E6 strain was isolated from *Deios flavopicta* in Espirito Santo State, Brazil. It was maintained as previously described (Nakazato et al. 2006). *A. tumefaciens* EHA105 strain was a kind gift of G. Pasquali (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) and was grown at 28°C and maintained in Luria–Bertani medium (Sambrook and Russel 2001). *Escherichia coli* TG2 strain was used for plasmid construction and propagation and was maintained in Luria–Bertani medium (Sambrook and Russel 2001). Medium for fungi was Cove's medium (MC, Nakazato et al. 2006). Agrotransformation was conducted in liquid and solid induction media (IM, Covert et al. 2001).

Nucleic acids manipulations and plasmids construction

All DNA manipulations were done by using standard procedures (Sambrook and Russel 2001). DNA from *M. anisopliae* was obtained from mycelial mat grown in MC at 28°C in a shaking platform (150 rpm). Ribonucleic acid (RNA) was isolated from cultures in MC amended with 5 mM tryptophan.

The binary vector pPZP201BK (Covert et al. 2001) was used in all transformation procedures. The plasmid pCAAG3500 contains the ammonium glufosinate resistance marker (Nakazato et al. 2006) cloned into *EcoRI*/*HindIII* restriction sites of pPZP201BK plasmid. The plasmid pCAW5100 contains the *trp1* gene inactivation cassette. It was constructed initially by cloning a 2.5-kb *EcoRI*–*HindIII* fragment of the *trp1* gene encompassing the coding sequence (Staats et al. 2004) into the respective sites of the binary vector. Then, an internal 1-kb *PstI* fragment was replaced by a 3.5-kb selectable marker from plasmid pCAAG3500. Plasmid pCAW6700 contains a 6.7-kb fragment encompassing the wild-type *trp1* gene cloned into the *HindIII* restriction site of pPZP201BK.

Agrotransformation

The transformation of *M. anisopliae* mediated by *A. tumefaciens* was conducted according to previously described (Covert et al. 2001) with some modifications. A 100- μ L aliquot of a freshly prepared spore suspension (10^6 mL⁻¹) was mixed with an equal volume of bacterial cells containing a binary vector (optical density₆₆₀=0.5) grown in IM containing or not acetoseryngone (AS) at 200 μ M and spread on cellophane discs laid down on Petri dishes containing 1.5% agar-solidified IM with or without the addition of AS at 200 μ M. Plates were incubated at 25°C for 2 days and then overlaid with 0.7% agar-solidified MC containing 100 μ g mL⁻¹ of ammonium glufosinate. Plates were shifted to 28°C and visualized up to 15 days for selection of transformants. When transformation was carried out with the *trp1* disruption cassette pCAW5100, the medium for selection of transformants also included 5 mM tryptophan. The genetic complementation of *trp1* null mutants was carried out by amending the IM with 5 mM of tryptophan to generate germinative tubes, a requisite for transformation mediated by *A. tumefaciens*.

Results

The ability of *A. tumefaciens* to transfer the T-DNA to *M. anisopliae* was first evaluated by cocultivation of fungal spores with the bacteria carrying a vector containing only a selectable resistance marker (plasmid pCAAG3500, this

work). Three independent experiments were performed, and an average of 53 *M. anisopliae* ammonium glufosinate-resistant colonies was identified in the cellophane membranes. These transformants were shown to be mitotically stable (98%) over five rounds of cultivation in nonselective media and subsequent culture in selective media. The interaction between bacterial and fungal cells during the cocultivation was visualized by scanning electron microscopy (Fig. 1). After 2 days of incubation at cocultivation temperature, long germinating hyphae arose from conidia and were completely covered by bacterial cells. Moreover, a sheath of fibrous material, possibly formed by extracellular polysaccharide produced during cocultivation on carbohydrate containing media (Holt et al. 1994), could be visualized covering the interaction between the cells. Southern blot analysis of five randomly picked transformants revealed the presence of ectopic single-copy integration events in the genome of *M. anisopliae* (data not shown).

Aiming to set up a gene-targeting system in *M. anisopliae*, the *trp1* gene was elected as a target because null mutants of this gene should generate tryptophan auxotrophy in such transformants, an easy phenotype for the selection. The inactivation of the *trp1* gene was carried out by using a plasmid construct encompassing an ammonium glufosinate resistance cassette flanked by *M. anisopliae trp1* gene sequences (Fig. 2a). One hundred and fifty-nine colonies were recovered from three transformation membranes overlaid with MC added with ammonium glufosinate and tryptophan. From that, 35 (22%) fungal colonies were unable to grow in tryptophan-lacking media.

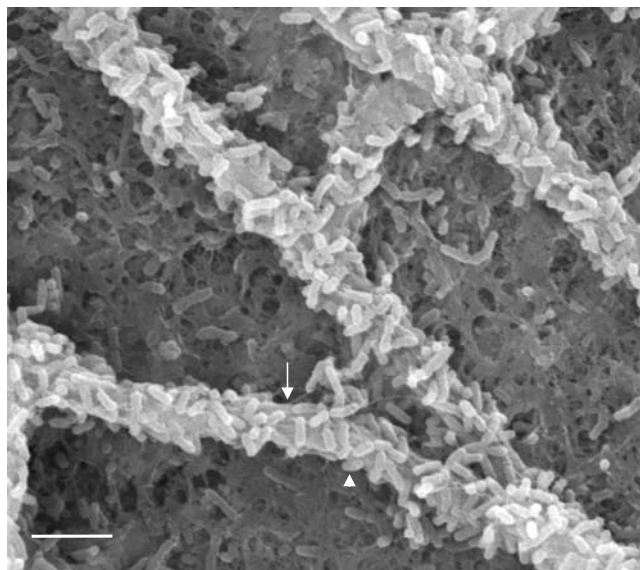


Fig. 1 Interaction of *A. tumefaciens* and *Metarhizium anisopliae* cells during cocultivation observed by scanning electron microscopy. The arrow indicates an active growing hypha. Arrowhead indicates *A. tumefaciens* covering the fungal cells. Bar=5 μ m

Southern blot analysis was conducted with six randomly picked tryptophan auxotrophs and the wild-type E6 strain. By using a 3' *trp1* gene-flanking sequence as a probe, a 6.7-kb hybridization signal was visualized in the wild type, while a larger (approx. 9.2 kb) hybridization signal was detected in five out of six auxotrophic transformants tested (Fig. 2b). The remaining transformant rendered a hybridization signal of approx. 8 kb (Fig. 2b), as a result of an unexpected rearrangement of the inactivation cassette integrated at the *trp1* locus. When the same blot was probed with the selectable marker (*bar* gene) as a probe, a 9.2-kb hybridization signal was detected in five out of six transformants analyzed. An 8-kb hybridization signal was detected in the remaining transformant analyzed but not in the wild-type DNA (data not shown). Total RNA was extracted from mycelia from both the wild type and one of the *trp1* null mutants and submitted to reverse transcriptase polymerase chain reaction, using primers flanking the *trp1* gene intron, to evaluate the transcript synthesis of the *trp1* gene null mutant as compared to the wild-type strain. The amplicon I was generated by the 3' end of the coding region spanning over the inactivated region of the *trp1* gene, which is 1.5 kb in size and should be generated by the wild-type gene only. Amplicon II is 340 bp long and was generated by both wild-type and inactivated *trp1* gene (Fig. 2a). The wild-type strain produces both amplicons I and II, while only amplicon II is generated by the *trp1* gene-inactivated mutant. The mutant also synthesizes a shorter truncated nonfunctional *trp1* transcript that retains the intron (Fig. 2c).

To test the efficacy of gene targeting in *M. anisopliae* through ATMT, the tryptophan-auxotrophic mutant strain was subjected to genetic complementation with a binary vector carrying the wild-type copy of the *trp1* gene that should release the auxotrophy. We found that transformation occurred only when the IM (medium used for cocultivation) was supplemented with tryptophan. This suggests that conidial germination is a requisite for agrotransformation. The cocultivation membranes were then laid onto media lacking tryptophan, rendering high-efficiency complementation (average of 155 prototrophic transformants per membrane). The transformation recipient strain is auxotrophic for tryptophan and resistant to ammonium glufosinate (*bar* gene). Therefore, integration by homologous recombination rendered transformants capable of growth in the absence of tryptophan and sensitive to ammonium glufosinate. On the other hand, the transformants resultant from ectopic events of integration should be phototrophic, however, ammonium glufosinate-resistant colonies. The phenotypic screening of 100 transformants revealed that no ectopic integration events occurred because all 100 transformants were sensitive to ammonium glufosinate. This was further confirmed by

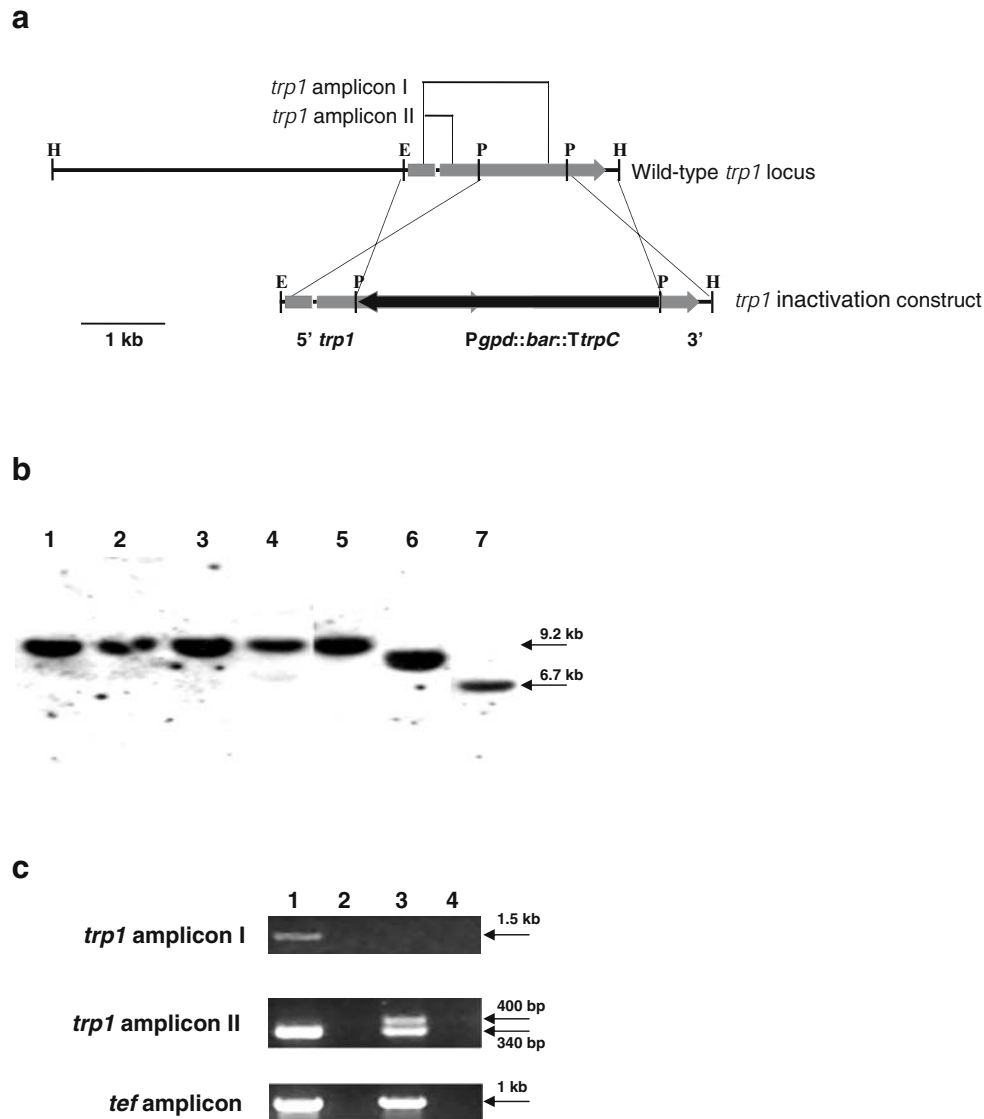


Fig. 2 Gene inactivation targeted to the *M. anisopliae trp1* gene. **a** The genomic locus spanning the *trp1* gene (*upper panel*) and the inactivation cassette (*lower panel*). *Pgd* *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter. *bar* ammonium glufosinate resistance gene. *TrpC* *A. nidulans trpC* terminator. **b** Genomic DNA digested with *Hind*III restriction enzyme was electrophoresed, transferred to nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Biosciences), and probed with the *M. anisopliae* 3' *trp1* gene-flanking fragment, used in the inactivation cassette construction. *Lanes 1* to *6* are randomly picked auxotrophic tryptophan transformants, and *lane 7* is the wild-type E6 strain. **c** RT-PCR analysis of *trp1* transcripts from inactivated auxotrophs. RNA samples extracted from wild-type and tryptophan-

auxotrophic strains were submitted to reverse transcription using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). *trp1* cDNAs were amplified by two sets of primers flanking the intron, generating amplicons from the 5' fragment of the gene used in the inactivation cassette construction (*upper panel*) or from interrupted *trp1* mutant (*middle panel*). RNA loading control was the amplicon from *tef-1 α* cDNA (*lower panel*). *Lanes 1* and *3* are cDNAs from wild-type and auxotrophic strains, respectively. *Lanes 2* and *4* are control reactions with no reverse transcriptase added. *Numbers on the right* represent amplicon or hybridization signals sizes based on lambda *Hind*III molecular size marker. The localization of amplicons is represented in **a**

Southern blot analysis of six randomly picked transformants. Probing the blots with the 3' *trp1* gene-flanking sequences of the inactivation cassette showed the same hybridization pattern of 6.7 kb in the wild-type strain and in all six genetically complemented transformants, indicating the replacement of the inactivated copy of the *trp1* gene by the transforming wild-type copy. The *trp1* null mutants display the 9.2-kb hybridization signal (Fig. 3).

Discussion

Agrotransformation has become a powerful method for functional genomics analysis of filamentous fungi (Weld et al. 2006). The currently known species in which this methodology was applied counts for more than 50 species, including some recalcitrant fruit body-forming and ectomycorrhizal fungi (Michiels et al. 2005b). Most species

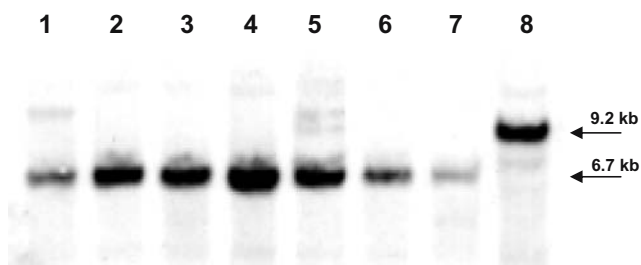


Fig. 3 *M. anisopliae trp1* null mutant genetic complementation. Genomic DNA from six randomly picked transformants, prototrophic to tryptophan, was digested with *Hind*III, electrophoresed, blotted to nylon membrane, and probed with a *trp1* gene fragment. Numbers on the right represent hybridization signals sizes based on lambda *Hind*III molecular size marker. Lanes 1 to 6 are prototrophic tryptophan transformants, lane 7 is the wild-type strain, and lane 8 is DNA from a *trp1* null mutant

transformed were tested only by expression of a reporter gene; however, targeted gene inactivation was conducted with Agrottransformation in *Monilinia fructicola* (Lee and Bostock 2006), *Verticillium dahliae* (Rauyaree et al. 2005), *A. fumigatus* (Sugui et al. 2005), and at least 13 other fungal species (Michielse et al. 2005b).

In this paper, we described the agrottransformation and targeted gene inactivation of an anabolic gene in the filamentous entomopathogenic fungus *M. anisopliae*, showing that this method is about 100 times more efficient than conventional methods previously reported for this fungus (Bogo et al. 1996; St. Leger et al. 1995). Recently, Fang et al. 2006 published the agrottransformation of *M. anisopliae* using a T-DNA binary vector carrying a selectable marker (*benA* gene, coding benomyl resistance) and a reporter cassette (*egfp*, coding enhanced green fluorescent protein). In our experiments, similar transformation efficiencies were achieved and the ectopic integration pattern illustrates the possibility of generating a library of tagged insertional mutants to assign gene function. Agrottransformation was performed in another strain of *M. anisopliae*, using the mutated benomyl-resistant *N. crassa* β -tubulin gene. Gene conversion at the β -tubulin locus was achieved in 66% of the transformants (Duarte et al. 2007), also supporting the potential use of agrottransformation in *M. anisopliae* gene targeting. In this paper, we report gene inactivation in *M. anisopliae* using agrottransformation. Both, gene disruption and insertional mutagenesis, are of importance for the generation of null mutants deficient in the infection process.

The frequency of gene targeting is directly dependent upon the length of flanking sequences. The 22% of homologous recombination achieved here, using 900- and 620-bp flanking sequences at 5' and 3', respectively, is in agreement with results described for the disruption of the *pyrG* gene in *A. awamori* (Michielse et al. 2005a) and the *albin1* gene disruption in *Ophiostoma piliferum* (Hoffman and Breuil 2004). When larger stretches of flanking

sequences were used, the frequency of gene targeting raised up to 50% (Lee and Bostock 2006).

Genetic complementation of auxotrophic markers is an attractive system for transformation selection (for a review, see Ruiz-Díez 2002), and the use of tryptophan biosynthetic genes for this purpose was applied to several filamentous fungi, using both homologous and heterologous genes (Casselton and De La Fuente-Herce 1989; Goosen et al. 1989; Mullin et al. 1993). In this paper, we show that *M. anisopliae trp1* null mutants were successfully transformed to prototrophy using the wild-type *trp1* gene. This opens the possibility of generating genetically modified *M. anisopliae* strains lacking the ammonium glutofosinate or benomyl resistance genes, the two most commonly used selectable markers for transformation of this fungus. Moreover, other anabolic genes can be used for generation of auxotrophic markers, such as *pyrG* and *argB*. The release of genetically modified organisms is governed by strict regulations in several countries, mainly in relation to the presence of dominant selectable markers, such as those used in *Metarhizium* transformation previously. Therefore, the genetic complementation of *M. anisopliae trp1* or other anabolic genes to construct null mutants represent an alternative for transformation selection.

This work opens possibilities to a wider understanding of *M. anisopliae* biology. Methods for isolation of null mutants are fundamental in elucidating the infection process. Efficient and straightforward methodologies are necessary because several candidate genes isolated by methods such as representational difference analysis (Dutra et al. 2004) are to be tested.

Acknowledgements This work was supported by grants from CNPq, CAPES, and FAPERGS. The authors wish to thank W. Arruda for the SEM and the PIGS sequencing network at the CBiot-UFRGS. The authors thank G.H. Goldman and A. Zaha for critically reading of the manuscript.

References

- Arruda W, Lubeck I, Schrank A, Vainstein MH (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol* 37:231–244
- Bird D, Bradshaw R (1997) Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 255:219–225
- Bogo MR, Vainstein MH, Aragao FJ, Rech E, Schrank A (1996) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 142:123–127
- Casselton LA, De La Fuente-Herce A (1989) Heterologous gene expression in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* 16:35–40
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C, Gay G, Marmeisse R (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for

- insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS Microbiol Lett 220:141–148
- Covert SF, Kapoor P, Lee M, Briley A, Nairn CJ (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. Mycol Res 105:259–264
- de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat Biotechnol 16:839–842
- Duarte RTD, Staats CC, Fungaro MHP, Schrank A, Vainstein MH, Furlaneto-Maia L, Nakamura CV, Souza W, Furlaneto MC (2007) Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Lett Appl Microbiol 44:248–254
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Res Microbiol 155:245–251
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ (2006) Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Can J Microbiol 52:623–626
- Fang W, Zhang Y, Yang X, Zheng X, Duan H, Li Y, Pei Y (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. J Invertebr Pathol 85:18–24
- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St. Leger RJ (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. Microbiology 149:239–247
- Godio RP, Fouces R, Gudina EJ, Martin JF (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavatic acid-producing basidiomycete *Hypoloma sublateralitum*. Curr Genet 46:287–294
- Goosen T, van Engelenburg F, Debets F, Swart K, Bos K, van den Broek H (1989) Tryptophan auxotrophic mutants in *Aspergillus niger*: inactivation of the *trpC* gene by cotransformation mutagenesis. Mol Gen Genet 219:282–288
- Hoffman B, Breuil C (2004) Disruption of the subtilase gene, *albin1*, in *Ophiostoma piliferum*. Appl Environ Microbiol 70:3898–3903
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative microbiology. Williams and Wilkins, Maryland
- Kassa A, Stephan D, Vidal S, Zimmermann G (2004) Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged spores and aerial conidia for the control locusts and grasshoppers. Biocontrol 49:63–81
- Lazzarini GM, Rocha LF, Luz C (2006) Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. Mycol Res 110: 485–492
- Lee MH, Bostock RM (2006) *Agrobacterium* T-DNA-mediated integration and gene replacement in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. Curr Genet 49:309–322
- Lima IG, Duarte RT, Furlaneto L, Baroni CH, Fungaro MH, Furlaneto MC (2006) Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. Lett Appl Microbiol 42:631–636
- Meyer V, Mueller D, Strowig T, Stahl U (2003) Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. Curr Genet 43:371–377
- Michiels CB, Arentshorst M, Ram AF, van den Hondel CA (2005a) *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. Fungal Genet Biol 42:9–19
- Michiels CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF (2005b) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Curr Genet 48:1–17
- Mullin PG, Turgeon BG, Yoder OC (1993) Complementation of *Cochliobolus heterostrophus* *trp*-mutants produced by gene replacement. Fungal Genet Newsl 40:51–53
- Nakazato L, Dutra V, Broetto L, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. Appl Microbiol Biotechnol 72:521–528
- Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD, Kang S, Bhat RG, Subbarao KV, Grant SJ, Dobinson KF (2005) Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. Curr Genet 48:109–116
- Ruiz-Diez B (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. J Appl Microbiol 92:189–195
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Scholte EJ, Knols BG, Takken W (2006) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Malar J 283:45
- St. Leger R, Shimizu S, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW (1995) Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. FEMS Microbiol Lett 131:289–294
- Staats CC, Silva MS, Pinto PM, Vainstein MH, Schrank A (2004) The *Metarhizium anisopliae* *trp1* gene: cloning and regulatory analysis. Curr Microbiol 49:66–70
- Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. Appl Environ Microbiol 71:1798–1802
- Wang C, Hu G, St. Leger RJ (2005) Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. Fungal Genet Biol 42:704–718
- Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Res 16:31–44

4.3. CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES POR AGRO-TRANSFORMAÇÃO NO FUNGO *M. ANISOPLIAE*

Em decorrência da alta eficiência de transformação apresentada pela Agro-transformação de *M. anisopliae*, investiu-se na construção de uma biblioteca de mutantes por inserção aleatória do T-DNA com o intuito de elucidar a função de genes por genética direta. Esta abordagem tem sido utilizada principalmente em fungos e plantas, como nos seguintes casos: o arroz (AN ET AL., 2005), a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (AZPIROZ-LEECHAN & FELDMANN, 1997), os fungos *Cryptococcus neoformans* (WALTON ET AL., 2005) e *Magnaporthe oryzae* (BETTS ET AL., 2007; JEON ET AL., 2007).

Utilizando o sistema de Agro-transformação acima descrito (STAATS ET AL., 2007), foi iniciada a construção de uma biblioteca com cerca de 700 mutantes, seguida da análise de alterações fenotípicas quando cultivadas em meio mínimo. Foram detectados tanto mutantes incapazes de produzir conídeos quanto mutantes com alterações na coloração de conídeos.

4.3.1. Materiais e Métodos

4.3.1.1. Microrganismos

O fungo filamentoso *M. anisopliae* linhagem E6, considerado neste trabalho como linhagem selvagem (WT), isolado de *Deois flavopicta* no estado do Espírito Santo e gentilmente cedido pelo Professor João Lúcio de Azevedo (Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ – USP) foi utilizado na realização deste trabalho. Sua manutenção foi em Meio de Cove – MC (COVE, 1966) e os esporos foram coletados e armazenados à temperatura de 4 °C.

A linhagem de *E. coli* utilizada foi a TG2 e sua manutenção foi em meio LB de acordo com protocolos padrão (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A linhagem de *A. tumefaciens* EHA105 foi utilizada nos experimentos de Agro-transformação. A preparação de células quimiocompetentes e a transformação foram realizadas de acordo com o método de congelamento e descongelamento (HOLSTERS *ET AL.*, 1978).

4.3.1.2. Agro-transformação

A transformação mediada por *A. tumefaciens* do fungo *M. anisopliae* utilizou o protocolo descrito abaixo independente do vetor plasmidial binário utilizado. Foi utilizado o meio IM (0,18% glicose para meio líquido ou 0,09% para meio sólido; 0,5% de glicerol; 0,058% KH₂PO₄; 0,082% K₂HPO₄; 0,0006% NaCl; 0,02% MgSO₄; 0,00026% CaCl₂ e 0,02% (NH₄)₂SO₄; 40 mM MES) adicionado do indutor 200 µM acetoseringona.

Um pré-inóculo de *A. tumefaciens* transformado com o vetor apropriado (neste caso o vetor *pbar*^R) foi cultivado por 24 H à temperatura de 28 °C com agitação (200 RPM) em meio LB acrescido de canamicina (100 µg/mL). As células foram coletadas a partir de uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo por centrifugação (5.000 g por 10 minutos, microcentrífuga) e lavadas

com Meio IM. Estas células foram inoculadas em 10 mL do Meio IM em uma concentração de 0,15 OD₆₆₀. As células foram cultivadas a temperatura de 28 °C com agitação (200 RPM) até atingir OD₆₆₀ igual a 0,8. Alíquotas de 100 µL dos cultivos em IM foram misturados a 10⁵ esporos de *M. anisopliae* e a mistura foi espalhada, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, sobre uma membrana de celofane previamente esterilizada em autoclave e dispostas sobre IM sólido em placas de Petri, sendo incubadas a 25°C por três dias. Após este período, 10 mL de meio MC sólido acrescido de glifosinato de amônio (200 µg/mL) foi adicionado sobre as membranas e incubado por mais 15 dias na mesma temperatura e examinado diariamente para o aparecimento de colônias dos transformantes.

4.3.1.3. Seleção e análise molecular dos mutantes insercionais

Foram selecionados para caracterização os mutantes que apresentavam alterações morfológicas em comparação com a linhagem selvagem não transformada, quando cultivados em meio sólido MC. Foram analisadas diferenças na conidiação e na coloração dos conídeos.

Para caracterizar os transformantes, a extração de DNA e a análise por *Southern* foram realizadas por métodos padrão (NAKAZATO *ET AL.*, 2006, SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.3.1.4. Análise de sensibilidade à radiação UV-A

Para analisar a sensibilidade à luz UV do mutante defeutivo na coloração de esporos (*albin1*), diluições apropriadas das suspensões de esporos da linhagem E6 e do mutante *albin1* foram semeadas em meio MC em placas de Petri (90 x 15 mm) e submetidas à irradiação de 0, 5 ou 10 kJ/m² de UV-A no forno Stratalinker 1800 UV Crosslinker (Stratagene). Após a

irradiação, as placas foram incubadas à temperatura de 28 °C por três dias e o grau de germinação avaliado. Este foi calculado pela relação entre o número de colônias que germinaram em determinado tratamento (5 ou 10 kJ/m²) e o controle (0 kJ/m²), sendo expressos como percentual.

4.3.2. Resultados

Com o objetivo de construir um banco de mutantes para caracterização de determinantes de patogenicidade do fungo entomopatógeno *M. anisopliae* por genética direta, iniciamos um sistema para geração massiva de mutantes aleatórios por inserção. Assim, foi iniciada a construção de um banco com cerca de 700 transformantes em diversos experimentos de transformação. A eficiência média de transformação foi de cerca de 30 transformantes por 10^5 conídeos por membrana.

A análise das alterações morfológicas foi realizada durante o cultivo destes transformantes em meio sólido MC. Foram identificados pelo menos duas classes de alterações morfológicas macroscópicas em relação à linhagem E6 (Figura 4.1A): (i), deficiência no desenvolvimento de conídios, como colônias com menor produção de conídeos (Figura 4.1B), ou completa falta de produção de conídeos (Figura 4.1C) e (ii), alterações na pigmentação de conídios (Figura 4.1D)

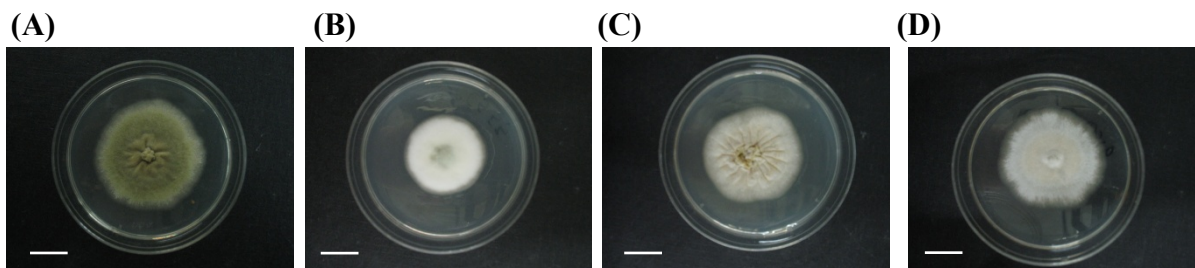


Figura 4.1: Morfologia de transformantes com alterações morfológicas. São mostrados os aspectos de colônias das linhagens selvagem E6 (A), CCS498 (B), CCS48 (C) e CCS16 (D) em meio MC cultivado à temperatura de 28 °C até a esporulação. A barra representa 1 cm.

Experimentos de *Southern blot* foram realizados para avaliar o padrão de integração do T-DNA no genoma de oito transformantes escolhidos aleatoriamente. A análise do padrão de hibridização utilizando DNA genômico total destes oito transformantes digerido com a enzima de restrição EcoRI, o qual reconhece apenas 1 sítio no T-DNA, revelou que a

integração não teve preferência por um sítio específico no genoma. Foi utilizado como sonda um fragmento correspondente à sequência codificante do gene *bar* a (Figura 4.2).

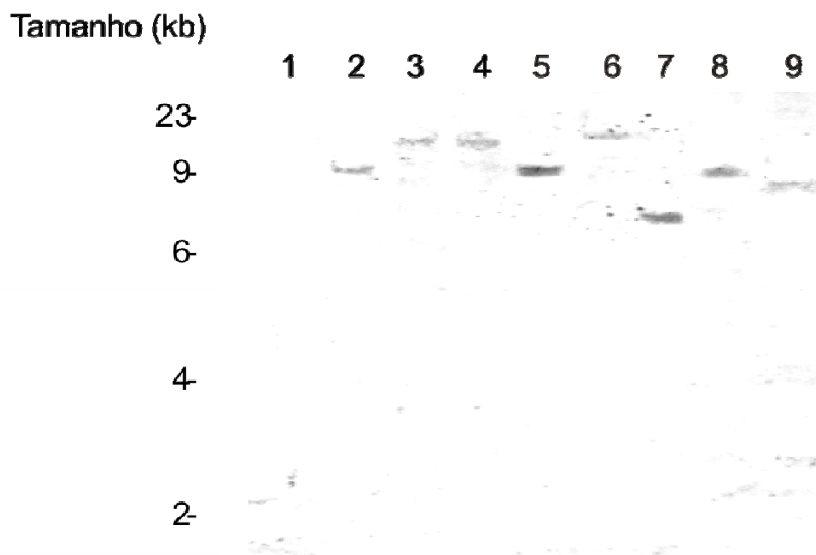


Figura 4.2: Avaliação do padrão de integração do cassete *bar*^R na biblioteca de mutantes insercionais. *Southern blot* de DNA genômico total da linhagem selvagem (canaleta 1) e de 8 transformantes escolhidos ao acaso (canaletas 2 a 9) digerido com a enzima de restrição EcoRI. Essas amostras foram hibridizadas contra sondas representando a região codificante do gene *bar*. Os números à esquerda representam os tamanhos do marcador.

A linhagem que apresentou deficiência na coloração de esporos foi utilizada em experimentos posteriores. A pigmentação de conídeos de *M. anisopliae* está diretamente relacionada à tolerância às radiações UV e solar (BRAGA *ET AL.*, 2006; RANGEL *ET AL.*, 2006). Desta forma, foi escolhido o transformante denominado *albin1* (Figura 4.1D) como alvo para estudos da sensibilidade à radiação UV-A. Diluições seriadas foram realizadas e um inoculo de 500 conídeos das linhagens selvagem ou do mutante *albin1* foi espalhado em meio MC sólido e irradiados com doses de UV-A de 0, 5 ou 10 kJ/m².

A radiação UV-A não diminuiu a viabilidade dos conídeos da linhagem selvagem nas doses de 5 e 10 kJ/m². Não houve também diferenças na viabilidade de conídeos para a linhagem *albin1* exposta as mesmas doses de radiação (Figura 4.3).

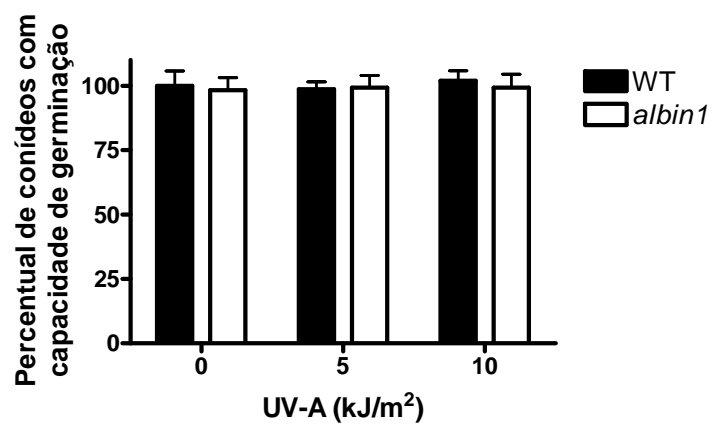


Figura 4.3: Sensibilidade à UV-A das linhagens selvagem e *albin1*. Viabilidade de germinação de conídeos irradiados com diferentes doses de UV-A. São expressas as médias relativas de três experimentos independentes.

4.3.3. Discussão

A utilização da Agro-transformação na elucidação da função gênica em fungos filamentosos tem sido bem sucedida, usando estratégias de silenciamento e inativação de genes (WELD *ET AL.*, 2006). Inúmeras espécies tiveram genes estudados por inativação gênica, entre elas, *M. anisopliae* (FANG *ET AL.*, 2007; STAATS *ET AL.*, 2007).

Em 2006, a Agro-transformação começou a ser utilizada em fungos filamentosos em estudos de genética direta de forma massiva. Com a construção de bancos de mutantes, projetos para a clonagem de genes relacionados a um determinado fenótipo estão sendo conduzidos. Dois grandes projetos foram publicados para a caracterização e clonagem de genes no fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae*. Com a construção de uma biblioteca de mais de 20.000 mutantes deste fungo, JEON e colaboradores (2007) realizaram a análise para a detecção de alterações em diversas funções: taxa de crescimento, pigmentação, conidiação, germinação, formação de apressório, morfologia dos conídeos e patogenicidade. Cerca de 2.400 transformantes apresentaram defeitos em pelo menos uma dos fenótipos acima citados, sendo 646 deles deficientes na infecção do modelo experimental. Foi realizada uma análise das regiões flanqueadoras do sítio de integração do T-DNA destes mutantes e os genes inativados pela integração do T-DNA foram descritos como possíveis determinantes de patogenicidade (JEON *ET AL.*, 2007).

Um estudo com um maior número de transformantes (cerca de 55.000) foi realizado também para o fitopatógeno *M. oryzae*. Também foram analisados defeitos em taxa de crescimento, pigmentação, conidiação, germinação, formação de apressório, morfologia dos conídeos e patogenicidade. Os estudos de mutantes defectivos na patogênese revelaram a completa falta de patogenicidade em 38 transformantes e a diminuição da patogenicidade em 90 transformantes, comparados ao tipo selvagem. A análise para determinar o sítio de

inserção do T-DNA permitiu prever a função de cerca de 60 genes como possíveis determinantes de patogenicidade (BETTS *ET AL.*, 2007).

A construção de um banco de mutantes insercionais em *M. anisopliae* foi realizada e atualmente conta com cerca de 700 transformantes. Um dos primeiros fenótipos analisados nestes tipos de estudo é a auxotrofia, devido ao isolamento de marcas de seleção para experimentos de transformação (BETTS *ET AL.*, 2007). Uma vez que a marca de seleção utilizada requer a ausência de glutamina no meio, foi utilizado o meio mínimo, o qual não permitia fazer a distinção de mutantes auxotróficos. A biblioteca aqui descrita permitiu isolar mutantes com alterações morfológicas: deficiência na produção ou na pigmentação de esporos. Para um mutante com esporos de coloração branca (*albin1*), foi testada a sensibilidade de conídios à radiação UV-A e não sendo detectada diferença significativa em relação à linhagem selvagem.

A pigmentação de conídios é de extrema importância para *M. anisopliae* em decorrência do seu ciclo de vida. Devido à exposição à radiação solar, conídios de *M. anisopliae* podem diminuir a sua taxa de germinação, bem como perder sua capacidade infectiva (BRAGA *ET AL.*, 2006; RANGEL *ET AL.*, 2006). A exposição à radiação solar pode ser deletéria tanto pelo dano causado pela radiação UV-B, absorvida pelo DNA e originando mutações, quanto pela radiação UV-A, responsável pela geração de estresse oxidativo o qual, por meio de espécies reativas de oxigênio, causa dano indireto ao DNA (BRAGA *ET AL.*, 2006). Em geral, os fungos produzem diversos pigmentos como estratégia acessória à maquinaria de reparo de lesões causadas ao DNA para filtrar a radiação UV. Dentre estes pigmentos podem ser citados a melanina (GOMEZ & NOSANCHUCK, 2003) e carotenóides (ARMSTRONG & HEARST, 1996).

Estudos realizados por BRAGA e colaboradores (2006) visaram avaliar a sensibilidade de diferentes mutantes (induzidos por radiação UV) de *M. anisopliae* à radiação solar simulada. As linhagens mutantes foram mais sensíveis à radiação em relação à linhagem selvagem. Além disso, os mutantes de coloração igual apresentaram a mesma sensibilidade, ocorrendo diminuição da sensibilidade conforme a tonalidade do pigmento se aproximava do verde (maior sensibilidade de mutantes com coloração branca em relação aos de coloração púrpura, os quais são mais sensíveis aos de coloração amarela, que são mais sensíveis que a linhagem selvagem, verde).

Posteriormente, RANGEL e colaboradores (2006) realizaram experimentos mais amplos para avaliar a sensibilidade de mutantes de coloração de pigmento, sendo analisada a sensibilidade frente a calor e as radiações UV-A, UV-B e solar simulada. Utilizando duas variedades (ARSEF 23 e ARSEF 2575), mutantes com deficiência na pigmentação de conídeos foram obtidos. Todos os mutantes foram mais sensíveis tanto à radiação UV-B quanto à radiação solar simulada. Houve redução da sensibilidade variando entre 20 a 80% conforme o mutante analisado. Entretanto, quando comparados os mutantes obtidos da linhagem ARSEF23 com os da ARSEF2575, ocorreu uma diminuição na viabilidade dos conídeos mais acentuada nos mutantes oriundos da linhagem parental ARSEF23 ao se empregar UV-B. O contrário aconteceu com o emprego da radiação UV-A (RANGEL *ET AL.*, 2006).

Estes dois exemplos demonstram o complexo sistema de proteção contra radiação presente em *M. anisopliae*. Aparentemente, este fungo não é capaz de produzir melanina (RANGEL *ET AL.*, 2006), um conhecido fator de proteção em fungos filamentosos (LANGFELDER *ET AL.*, 2003). Os experimentos aqui relatados sugerem que para a proteção contra a radiação UV-A, a pigmentação não é o único fator envolvido, levando em

consideração que o espectro de absorção de pigmentos extraídos de esporos não pode ser correlacionado com a sensibilidade à radiação UV (RANGEL *ET AL.*, 2006).

A construção de uma biblioteca de mutantes insercionais em *M. anisopliae* possibilita o estudo de genes por genética direta, podendo ser definidos diversos fatores de patogenicidade em experimentos de infecção experimental em modelos de estudo. Todas as metodologias aplicadas até agora no estudo de genes de *M. anisopliae* utilizam genética reversa (ver Tabela 1.1). Com a disponibilidade crescente de seqüências de genomas de fungos filamentosos, além de inúmeros projetos de seqüenciamento de bibliotecas de ESTs, a recuperação das seqüências flanqueadoras ao sítio de inserção do T-DNA permite a comparação entre estas seqüências e a predição da função do gene na região inativada.

5. MÓDULO II: CARACTERIZAÇÃO DO GENE *CHI3* DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

5.1. INTRODUÇÃO

As quitinases têm sido descritas como possíveis determinantes de patogenicidade em fungos entomopatógenos devido à presença de quitina na cutícula de insetos (ADAMS, 2004; ARRUDA *ET AL.*, 2005; DUO-CHUAN, 2006, SILVA *ET AL.*, 2005) e a elevada produção de atividade quitinolítica nos sobrenadantes de cultivos destes fungos (BARRETO *ET AL.*, 2004; MORAES *ET AL.*, 2003; SILVA *ET AL.*, 2005). No fungo *M. anisopliae*, há pelo menos duas demonstrações do possível envolvimento das quitinases no processo infectivo: a primeira pela constatação da presença da quitinase CHIT30, produto do gene *chi3*, durante o processo de infecção do carrapato *B. microplus* (SILVA *ET AL.*, 2005) e a segunda pela constatação da presença da quitinase CHIT42, produto do gene *chit1*, em eventos tardios da penetração, posterior à secreção de proteases (ST. LEGER *ET AL.*, 1996b).

Para melhor caracterizar os componentes individuais do sistema quitinolítico de *M. anisopliae*, enfocamos o gene *chi3*, devido à presença desta quitinase durante o processo de infecção e também por ter sido a primeira quitinase descrita a apresentar ambas as atividades de endoquitinase e de exoquitinase. Essa dupla atividade possivelmente atribuiria a esta quitinase CHIT30 uma maior eficiência na degradação de quitina. Para caracterizar o gene *chi3*, mutantes nulos foram gerados e analisados em diversas condições fisiológicas. Foram escolhidas aquelas condições nas quais a expressão do gene *chi3* selvagem era detectada, como em culturas do fungo em quitina ou NAG e sob condições de estresse, tal como o choque térmico. A localização celular desta proteína foi realizada pela construção de

linhagens contendo um cassete para a expressão de uma proteína de fusão à proteína repórter GFP e análise por microscopia confocal.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens de *Metarhizium anisopliae*, de *Escherichia coli* e de *Agrobacterium tumefaciens*, assim como sua manutenção e transformação, utilizadas para a realização dos experimentos deste módulo, foram descritas na seção de Materiais e Métodos do Módulo I (item 4.3.1.1).

5.2.1. Manipulação de ácidos nucléicos

A purificação de DNA foi realizada por métodos padrão (NAKAZATO *ET AL.*, 2006) e a extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen) segundo instruções do fabricante.

A clonagem de região 5' flanqueadora à região codificante do gene *chi3* foi procedida pela utilização da metodologia de *SiteFinding PCR*, uma técnica de *Chromosome Walking* utilizando PCR com anelamento de *primers* em baixas condições de estringência aliado a *primers* específicos para a região codificante do gene *chi3* (Tabela 5.1 – segundo TAN *ET AL.*, 2005). A seqüência do cDNA (Código de acesso no Genbank AY545982) foi utilizada para a construção dos primers *chi3R* e *3chi3R* (SILVA *ET AL.*, 2005).

Para a construção do cassete de inativação do gene *chi3*, foi adotada a estratégia de fusão por PCR (Figura 5.1, segundo YU *ET AL.*, 2004). Três amplicons obtidos com *primers* específicos (Tabela 5.1) foram utilizados para a construção de um cassete para a inativação do gene *chi3*: um fragmento DNA de 500 pb correspondente a região 5' flanqueadora à região

codificante do gene, um fragmento de DNA também com 500 pb correspondentes à região 3' da região codificante do gene e um fragmento de DNA de 2000 pb contendo a marca de seleção (cassete de expressão do gene *bar*, STAATS *ET AL.*, 2007). O amplicon resultante da PCR de fusão, contendo os dois fragmentos de 500 pb e o fragmento de 2 kb, foi primeiramente clonado no sítio de *Sma*I do vetor pUC18, seqüenciado para confirmar a seqüência, e subseqüentemente subclonado nos sítios de *Eco*RI e *Hind*III do vetor binário pPZP201-BK (COVERT *ET AL.*, 2001).

A construção do cassete para a expressão do gene *chi3* contendo uma fusão ao gene repórter *gfp* (Figura 5.2) foi realizada por três subclonagens de amplicons (*primers* descritos na Tabela 5.1) no vetor binário pPZP201-BK:(i), um amplicon de aproximadamente 2 kb obtido com os primers 5*chi*3F e 3*chi*3R, contendo a região 5' flanqueadora do gene, assim como a seqüência codificante sem o códon de parada, foi subclonado nos sítios de *Eco*RI e *Xba*I do vetor, produzindo o plasmídeo pFPC2000; (ii), um amplicon obtido do plasmídeo pANGFP (NAKAZATO *ET AL.*, 2006) com os primers *Fgfp*F e *Fgfp*R, contendo a região codificante do gene *gfp* sob o controle do terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, foi subclonado nos sítios de *Xba*I e *Pst*I do vetor obtido do plasmídeo pFPC2000, dando origem ao vetor pFPC3500; (iii) a este plasmídeo foi inserida a marca de seleção (cassete de expressão do gene *bar* – STAATS *ET AL.*, 2007) no sítio *Pst*I, dando origem ao plasmídeo contendo a construção final *pfuschi3* (Tabela 5.1 e Figura 5.2).

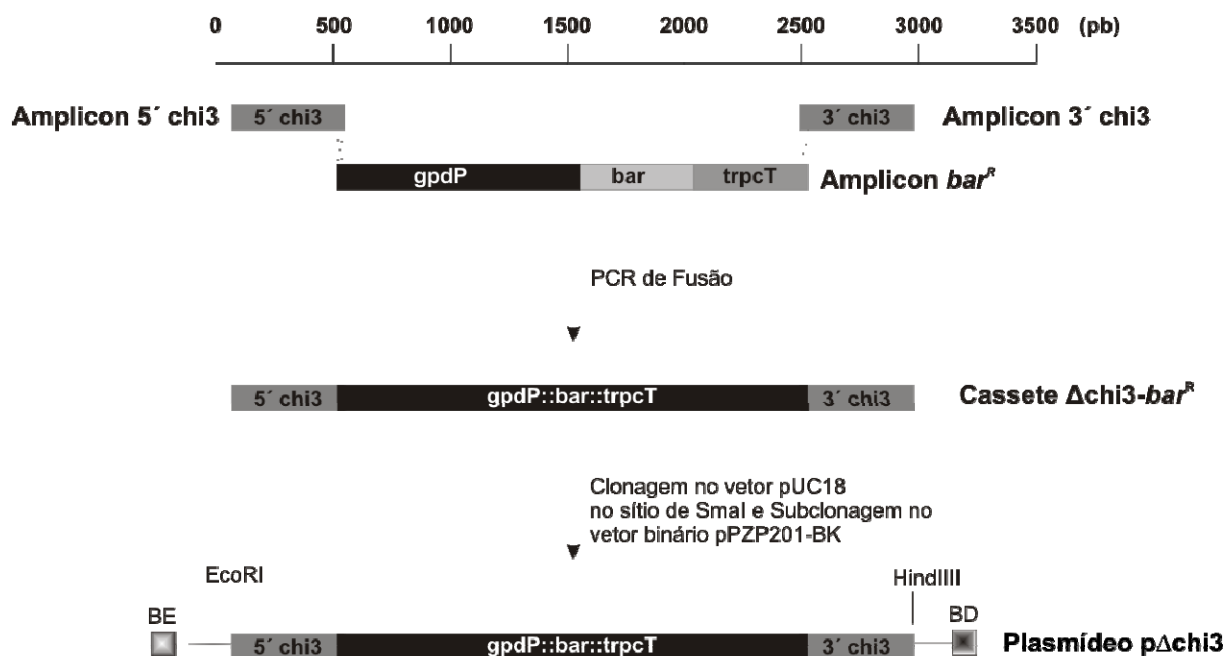


Figura 5.1: Estratégia para a construção do plasmídeo pΔchi3. Estão representados os três fragmentos de DNA utilizados no PCR para construção do cassete para nocaute do gene *chi3* de *M. anisopliae*. As abreviações representam trpCT, terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*; gpdP; promotor do gene *gpdA* de *A. nidulans*; *bar*, gene da enzima fosfotricina acetil transferase; BE e BD, bordas esquerda e direita do vetor binário.

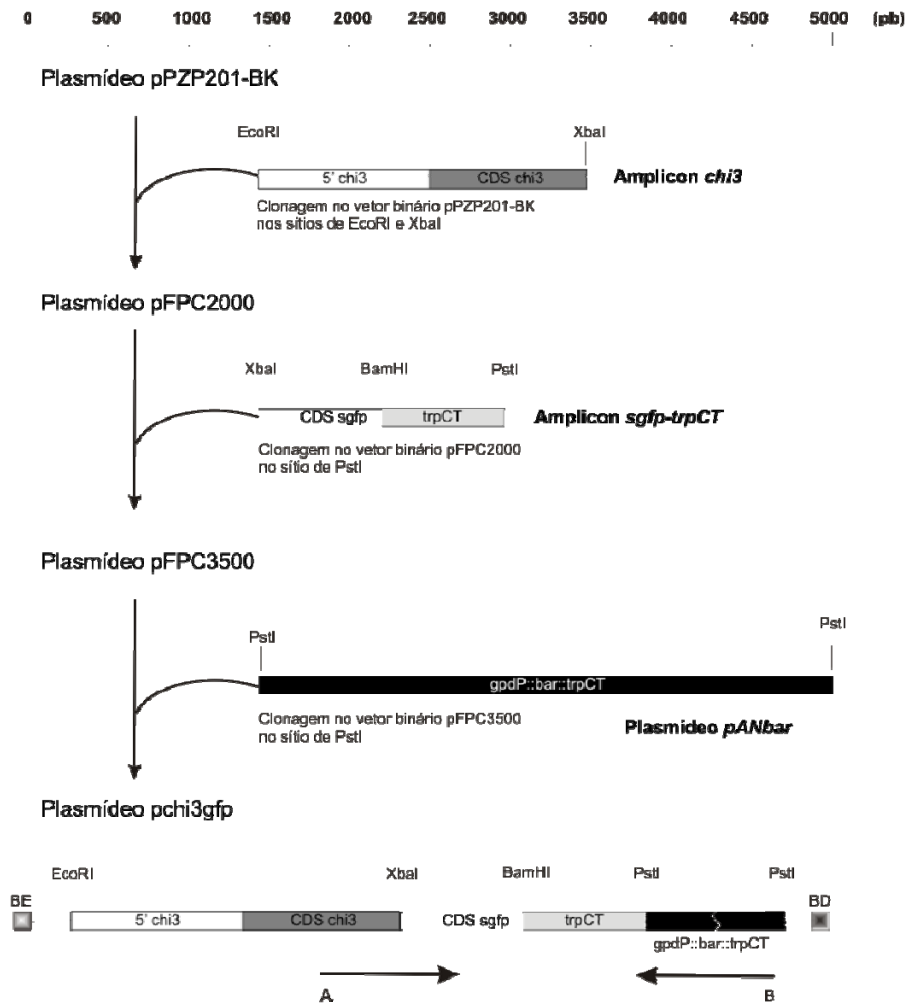


Figura 5.2: Estratégia para a construção da quitinase CHIT30 marcada com sGFP na sua porção C-terminal. Estão representados as três subclonagens no vetor binário para a construção do cassete para a expressão da proteína de fusão CHIT30::GFP. As abreviações representam CDS, seqüência codificante; 5', região 5' flanqueadora, *sgfp*, gene da proteína verde fluorescente; *trpCT*, terminador do gene *trpC* de *A. nidulans*; *gpdP*; promotor do gene *gpdA* de *A. nidulans*; *bar*, gene da enzima fosfotricina acetil transferase; BE e BD, bordas esquerda e direita do vetor binário. As setas abaixo do cassete do plasmídeo pchi3fus indicam o sentido da transcrição do cassete *chi3gfp* (A) ou da marca de seleção (B).

Tabela 5.1: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Propósito
5CHI3F	5'TACAGGCTGCGCCAATGCTG 3'	Construção plasmídeos p Δ chi3 e pchi3gfp.
5CHI3R	5'AGTCACCGGTCCTGTACAGCG GTCGTTAGCTCCCA 3'	Construção plasmídeo p Δ chi3
GFDBARF	5'CTGTACAGGACCGGTGACT 3'	Construção plasmídeo p Δ chi3
GFDBARF	5'GAGTAAAGAAGAGGAGCATG 3'	Construção plasmídeo p Δ chi3
3CHI3F	5'CATGCTCCTCTTCTTTACTCTAT TCCTCGGCGGTAC 3'	Construção plasmídeo p Δ chi3
3CHI3R	5'TCTAGACAAGTTAGCCTTAATA ATCTTCTGGTAATT 3'	Construção plasmídeos p Δ chi3 e pchi3gfp e SiteFinding.
FGFPF	5'TCTAGAGGAGGAGGAGGAGGA ATGGTGAGCAAGGGCG 3'	Construção plasmídeo pchi3gfp
FGFPR	5'CTGCAGGATTACCTCTAAACAA GTGTACCTGTGCAT 3'	Construção plasmídeo pchi3gfp
CHI3R	5'TTGGTCATGGAGGTAAC 3'	SiteFinding
SiteFinding1	5'CACGACACGCTACTCAACACAC CACCTCGCACAGCGTCCTCAAG CGGCCGCNNNNNGCCT 3'	SiteFinding
SPF1	5'CACGACACGCTACTCAACAC 3'	SiteFinding
qCHI3F	5'TAAACTCGGACGCTCAGGG 3'	qRT-PCR
qCHI3R	5'AAGGGGCTCGGATTGGTC 3'	qRT-PCR
qTUB1F	5'CATCTCTGGTGAACAGGGC 3'	q-RT-PCR
qTUB1R	5'AGTTGTCTGGGACGGAAAAG 3'	q-RT-PCR

5.2.2. Análise da atividade de quitinases

Meios de cultivo contendo quitina cristalina (Sigma) na concentração final de 1% (m/V) ou NAG na concentração final de 0,2 % (m/V), como únicas fontes de carbono e nitrogênio, foram utilizados para a indução da expressão de quitinases. Os cultivos foram realizados por distintos períodos de tempo (48, 72, 96 e 120 H) à temperatura de 28 °C com agitação (150 RPM). Os sobrenadantes dos cultivos foram filtrados em papel Whatmann e dialisados contra água destilada.

A análise de quitinases também foi realizada após a exposição de micélio da linhagem selvagem e do mutante Δ chi3 ao choque térmico. Esporos (10^6 /mL) das duas linhagens foram inoculados em meio Sabouraud e cultivados por 48 h a 28 °C com agitação (150 RPM). O micélio foi filtrado em Miracloth e lavado com solução salina estéril. Aproximadamente 1 g de micélio (massa úmida) foi transferida para meio mínimo (MM, Sais de Cove – Cove, 1976) e incubado por 1 ou 2 H a 28 °C com agitação (150 RPM). Os sobrenadantes dos cultivos (fração extracelular) foram filtrados em papel Whatmann e dialisados contra água destilada. Para obtenção das proteínas intracelulares e aquelas associadas à parede, o micélio coletado foi congelado em nitrogênio líquido, macerado em gral com o auxílio de pistilo e suspenso em 2 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8). Após 5 ciclos de agitação e vortex e incubação em gelo por 30 s, a amostra foi centrifugada (15000 g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante coletado e armazenado.

A concentração de proteínas foi determinada em fluorímetro Qubit ® (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante.

A medida da atividade quitinolítica de sobrenadantes de cultivo foi efetuada por quantificação de açúcares redutores liberados após a incubação com os oligômeros de NAG: N,N',N''- β -D-triacetilquitotriose; para detectar a atividade de exoquitinases e N,N',N'', N''''- β -D-tetraacetilquitotetraose; para detectar a atividade de endoquitinases segundo SILVA e colaboradores (2005).

Para a análise por *Western blot*, aproximadamente 200 μ g de proteínas dos sobrenadantes de cultivo, previamente dialisados, foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético para concentração de 10%, posteriormente lavados com acetona e suspensos em 15 μ L de água Milli-Q. Aproximadamente 100 μ g de proteínas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e eletrotransferidos

utilizando o sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) para membranas Hybond-P (Amersham Biosciences) segundo recomendações dos fabricantes. A análise por *Western blot* foi realizada com anticorpo anti-CHIT30 (SILVA ET AL., 2005) ou anti-GFP (Invitrogen) utilizando o sistema ECL Plus™ Western Blotting Detection (Amersham Biosciences) conforme recomendações do fabricante para a revelação.

5.2.3. Análise por PCR em tempo real dos transcritos do gene *chi3*

Para averiguar o padrão de transcrição do gene *chi3* em diversas condições de estresse, foi utilizado PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). A linhagem selvagem foi inoculada em meio Sabouraud por 48 h a 28 °C com agitação (150 RPM). O micélio foi filtrado em Miracloth e lavado com solução salina estéril. Aproximadamente 1 g de micélio (massa úmida) foi transferida para quatro diferentes meios de cultivo e incubados por 2 horas a 28 °C com agitação (150 RPM): meio mínimo (MM, Sais de Cove – Cove, 1976); MM acrescido de 1% (m/V) de glicose (MC); MM acrescido de 1M de sorbitol (MMS); MM acrescido de 0,25% (m/V) de quitina coloidal (MMQC). Alternativamente, apenas o cultivo em MM foi transferido para a temperatura de 42 °C e incubado por 2 h com agitação (MMCT).

Aliquotas de RNA total foram tratadas com DNase (Promega) previamente à transcrição reversa com oligo d(T) e M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados para analisar os transcritos do gene *chi3*, assim como do gene de normalizador de referência *tub1* estão listados na Tabela 5.1. As reações foram realizadas utilizando o sistema Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e analisadas no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Os resultados, analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estão apresentados como expressão relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

5.2.4. Análise da sobrevivência ao choque térmico

Esporos (300) das linhagem selvagem e do mutante Δ chi3 foram inoculados em membranas de celofane dispostas em meio MC sólido e incubados a 28 °C por 12 H para a formação de tubos germinativos. A membrana de celofane foi então transferida para meio MM sólido e submetida ao mesmo choque térmico descrito anteriormente. As membranas foram novamente transferidas para meio MC sólido e o número de sobreviventes foi determinado após 2 ou 3 dias de cultivo a temperatura de 28 °C pela visualização de colônias.

5.2.5. Microscopia

A linhagem selvagem e o mutante Δ chi3 foram cultivadas em meio MC a 28°C por diferentes períodos de tempo em lamínulas de microscopia dispostas em placas de Petri. Os tubos germinativos aderidos às lamínulas foram fixados com tampão de fixação [3,7% (v/v) formaldeído, 0,2% (v/v) de Triton X-100 em 50 mM tampão fosfato pH 7 por 5 minutos. Para visualizar o núcleo e os septos, foram utilizados os corantes DAPI e *Calcofluor White*, respectivamente (ST. LEGER *ET AL.*, 1991). Após a coloração, as lamínulas foram lavadas com tampão fosfato 50 mM pH 7 e avaliadas por microscopia de fluorescência.

5.2.6. Bioensaios

Machos do inseto *Dysdercus peruvianus* foram lavados em séries de banhos de hipoclorito de sódio (cloro ativo 0,3%) e água destilada estéril, cada um por 30 segundos. Para o bioensaio, grupos de 15 insetos foram mergulhados em suspensão de esporos (1×10^8 /mL) da linhagem selvagem ou do mutante Δ chi3 pelo mesmo período de tempo. Os insetos foram acondicionados em câmara úmida (> 90% umidade) com água e alimento *ad*

libitum e incubados em câmara de germinação a 28 °C. A incubação foi por um período de até 10 dias, sendo a mortalidade dos insetos observada diariamente. Como controle, os insetos foram mergulhados apenas em água destilada estéril. Os dados foram analisados pela metodologia probit no pacote de programas SPSS 13. Valores de LT50 foram considerados estatisticamente diferentes se os valores fiduciais referentes a cada análise não apresentavam sobreposição.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Clonagem e caracterização do gene *chi3* de *M. anisopliae*

Com o intuito de isolar e caracterizar a seqüência nucleotídica do gene *chi3*, utilizamos a estratégia de *SiteFinding* PCR (TAN ET AL., 2005) para clonar a sua região flanqueadora 5'. Os *primers* *chi3R* e *3chi3R* (Tabela 5.1), sintetizados com base na seqüência de um clone de cDNA isolado por *screening* imunológico de uma biblioteca de expressão (Número de acesso no NCBI AY545982, SILVA ET AL., 2005) foram utilizados em conjunto com *primers SiteFinding* (Tabela 5.1). Um amplicon de aproximadamente 1,5 kb foi clonado (Figura 5.3). A análise comparativa das seqüências mostrou que cerca de 500 nucleotídeos presentes na porção 3' deste fragmento correspondiam aos primeiros da seqüência codificante do cDNA previamente descrito. Um novo *primer* sintetizado com base nesta seqüência, *5chi3F*, associado ao *primer 3chi3R*, que anela no final da região codificante deste gene, permitiu a posterior amplificação de um fragmento de aproximadamente 2 kb a partir de DNA genômico. Este amplicon foi clonado e seqüenciado. A sua análise *in silico* mostrou a presença de motivos canônicos de promotor (TATA Box), assim como a região codificante.

A contigüidade destes fragmentos (região codificante e região 5' flanqueadora) foi demonstrada pela análise do padrão de hibridização utilizando DNA genômico total de *M. anisopliae* digerido com diferentes enzimas de restrição. Foi utilizado como sonda um fragmento correspondente à seqüência codificante do gene *chi3* ou a região 5' flanqueadora (Figura 5.4).

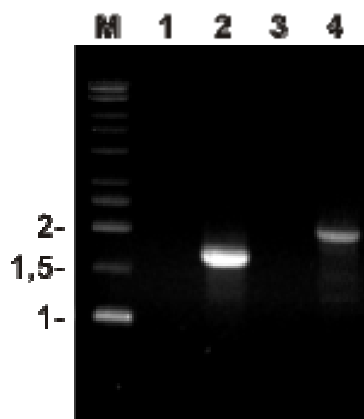


Figura 5.3: Obtenção de amplicons para a clonagem de parte da região 5' flanqueadora da região codificante do gene *chi3*. PCR *sitfinding* foi utilizado. Canelas 1 e 3: controles negativos das reações; Caneleta 2: *amplicon* obtido pela aplicação dos *primers* SF1 e *chi3R*; Caneleta 4: *amplicon* obtido pela utilização dos *primers* 5*chi3F* e 3*chi3R*, representando a região 5' flanqueadora e a região codificante. Os números à esquerda representam algumas bandas do marcador de tamanho molecular KiloBase DNA Marker (GE Helthcare).

Para determinar possíveis elementos canônicos para a ligação de fatores de transcrição foi realizada uma análise *in silico* baseada na seqüência nucleotídica da região 5' flanqueadora à região codificante do gene *chi3*. Foi utilizado o programa MatInspector (www.genomatix.de, CARTHARIUS *ET AL.*, 2005). A análise revelou a presença de diversos sítios potenciais para ligação de fatores de transcrição, como a seqüência reconhecida por um fator de choque térmico (HSF) em levedura a -1028 em relação ao sítio de início de tradução (TSP); a seqüência GATA a -1007 tsp, envolvida na utilização de fontes de nitrogênio em *A. nidulans* (PETERS & CADDICK, 1994); a seqüência para ligação de MIG1 a -1001 tsp, responsável pela repressão da transcrição mediada por catabólitos em levedura (NEEDHAM & TRUMBLY, 2006); o sítio para ligação do elemento STRE, relacionado ao estresse, em *T. atroviridae* (SEIDL *ET AL.*, 2005) a -934 tsp; o sítio para ligação de PacC, um regulador responsivo ao pH de *Aspergillus nidulans* (ESPESO *ET AL.*, 1997), a -875 tsp; o sítio para ligação de StuaP, um regulador da conidiogênese e da complexidade multicelular em *A. nidulans* (DUTTON *ET AL.*, 1997) a -384 tsp e putativos TATA Box a -166 e a -73 tsp (Tabela 5.2 e Figura 5.5).

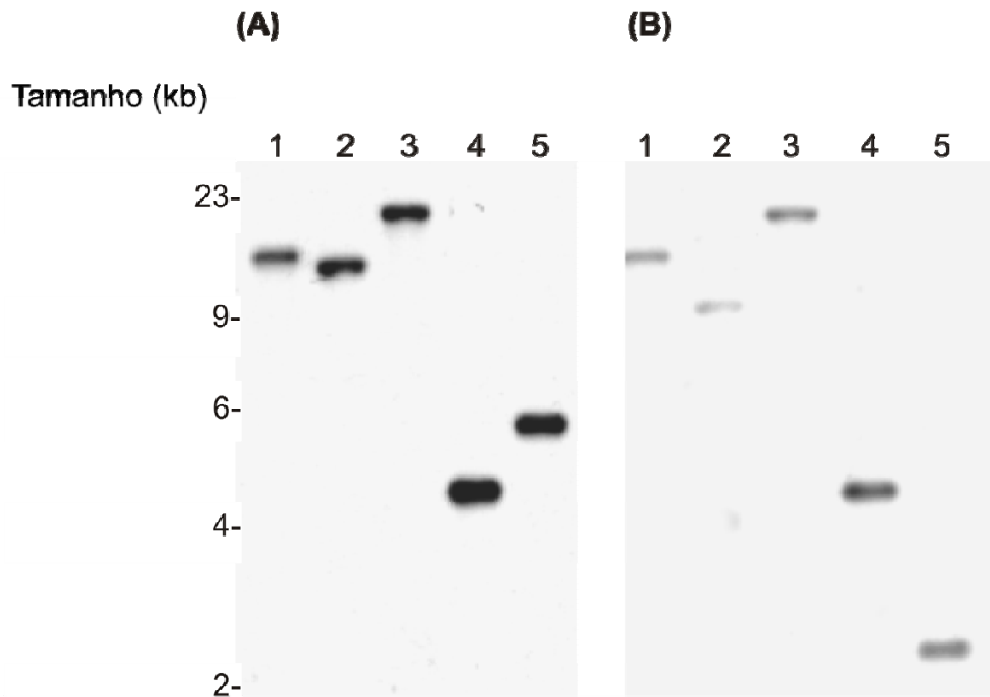


Figura 5.4: Organização genômica do gene *chi3*. *Southern blot* de DNA genômico total digerido as seguintes enzimas de restrição: canaleta 1, BamHI; canaleta 2, BglII; canaleta 3, EcoRI; canaleta 4, EcoRV; canaleta 5, HindIII. Essas amostras foram hibridizadas contra sondas representando a região codificante (A) ou a região 5' flanqueadora (B) do gene *chi3*. Os números à esquerda representam os tamanhos do marcador.

Uma representação gráfica da estrutura do gene *chi3* está apresentada na Figura 5.5. A região codificante deste gene é interrompida por um íntron de 47 nt na posição +502 em relação a TSP. A proteína predita deste gene tem massa molecular estimada de 33,9 kDa e um peptídeo sinal putativo foi identificado na região amino-terminal (SignalP V 3.0; BENDTSEN *ET AL.*, 2004) com a massa molecular predita de 2 kDa, o que produziria após o processamento uma quitinase com a massa molecular determinada para a proteína secretada e purificada CHIT30 (PINTO *ET AL.*, 1997).

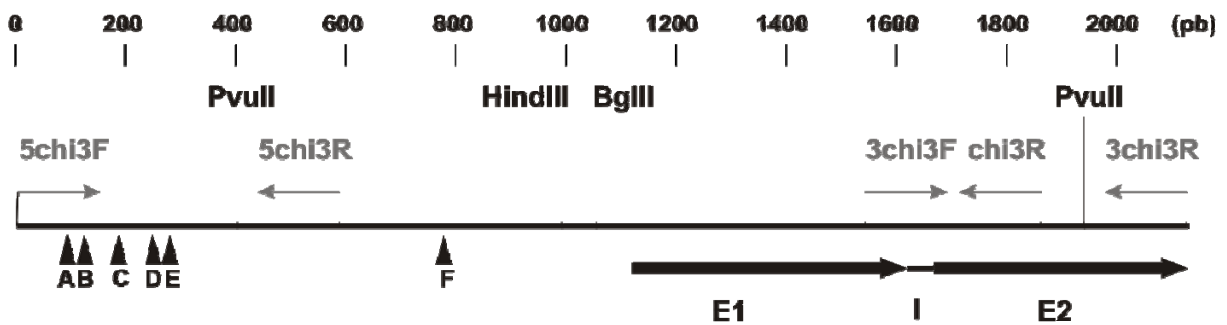


Figura 5.5: Mapa físico do gene *chi3*. Estão representadas a região codificante, os seus dois éxons (E1 e E2), o íntron (I) e os sítios para enzimas de restrição. Os triângulos à esquerda representam sítios para ligação de fatores de transcrição HSF (A), GATA (B), MIG1 (C), STRE (D), PacC (E), StuaP (F). As flechas em cinza representam a localização dos *primers* utilizados na clonagem do gene e na construção dos cassetes de inativação.

Tabela 5.2: Descrição das seqüências canônicas encontradas na região 5' flanqueadora do gene *chi3*.

Posição*	Fator putativo	Organismo descrito	Referência
-1028	HSF	<i>S. cerevisiae</i>	MARTINEZ-PASTOR <i>ET AL.</i> , 1996
-1007	AreA	<i>A. nidulans</i>	PETERS & CADDICK, 1994
-1001	MIG1	<i>S. cerevisiae</i>	NEEDHAM E TRUMBLY, 2006
-934	STRE	<i>T. atroviridae</i>	SEIDL <i>ET AL.</i> , 2004
-875	PacC	<i>A. nidulans</i>	ESPESO <i>ET AL.</i> , 1997
-384	StuaP	<i>A. nidulans</i>	DUTTON <i>ET AL.</i> , 1997
-166 e -73	TATA Box	<i>S. cerevisiae</i>	TIROSH <i>ET AL.</i> , 2007

* relativa ao sítio de início de tradução (TSP)

5.3.2. Padrão de expressão do gene *chi3* em condições de estresse

Em decorrência da existência de dois elementos canônicos relacionados ao estresse na região 5' flanqueadora do gene *chi3*, avaliamos a sua transcrição por qRT-PCR em tempo real em condições que mimetizam diferentes tipos de estresse. Micélio (1 g peso úmido) obtido de

um pré-cultivo em meio Sabouraud por 48 horas foi transferido para diferentes meios e condições de cultivo para a extração de RNA e avaliação da expressão. As condições experimentais foram: meio mínimo (MM), para avaliar os efeitos da privação de nutrientes; meio MM + glicose (MC), para avaliar a repressão catabólica; meio MM + quitina coloidal (MMQC), para avaliar a ativação; MM + sorbitol na concentração de 1 M (MMS), para avaliar o efeito do estresse hiperosmótico e MM e cultivo à temperatura de 42 °C (MMCT) para avaliar o efeito do choque térmico. Os cultivos em MM, MC, MMQC e MMS foram realizados à temperatura de 28 °C.

Utilizando como controle normalizador os níveis de expressão da β -tubulina (Palma, 2006), foi avaliado o nível dos transcritos *chi3* em cada condição.

Nas condições MM, MC e MMS, não houve variação estatisticamente significativa segundo ANOVA ($P > 0,05$), demonstrando que a privação de nutrientes, assim como o choque osmótico parecem não ativar a transcrição do gene *chi3* nas condições deste experimento. Entretanto, houve um aumento de cerca de 30 vezes da transcrição na condição choque térmico quando comparado às demais condições de cultivo. Este resultado sugere um envolvimento do gene *chi3* na manutenção ou reestruturação da parede celular durante o choque térmico. A ativação por um conhecido indutor da expressão, a quitina coloidal, se deu em uma escala menor, cerca de 10 vezes, ressaltando a importância deste gene em outros processos além da aquisição de nutrientes (Figura 5.6).

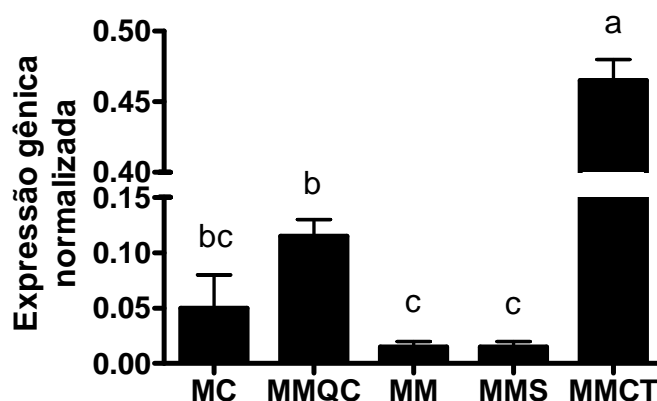


Figura 5.6: Análise quantitativa da expressão do gene *chi3* em condições de estresse. São expressos os valores da expressão relativa do gene *chi3* em relação ao normalizador (transcritos do gene *β tubulina*) em diferentes condições de estresse (MM, estresse por privação de nutrientes; MMS, estresse osmótico; MMCT, estresse por choque térmico) ou condições utilizadas como controle (MC, meio de Cove para controle negativo e MMQC, quitina coloidal para controle positivo). A mesma letra minúscula acima das barras representa médias sem diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste de Duncan ($\alpha < 0,05$).

5.3.3. Construção de um mutante com inativação do gene *chi3*

Para investigar a função da quitinase CHIT30, produto do gene *chi3*, em diversas condições fisiológicas do fungo *M. anisopliae*, construímos um mutante por inativação do gene *chi3*. Inicialmente foi construído um cassete de inativação pela estratégia de PCR de fusão. Este cassete, Δ *chi3-bar^R*, foi gerado pela amplificação de um fragmento de 500 pb da região 5' flanqueadora à região codificante do gene *chi3*, um fragmento de 500 pb da região 3' da região codificante e um fragmento contendo a marca de seleção (um cassete *bar^R* de cerca de 2Kb para a expressão do gene *bar*, cujo produto confere resistência a glifosinato de amônio). A aplicação destes três fragmentos de DNA em um PCR de fusão permitiu a construção do cassete de inativação Δ *chi3-bar^R* de aproximadamente 3 kb (Figura 5.1). O amplicon Δ *chi3-bar^R* foi clonado no vetor pUC18, sua seqüência foi verificada por

seqüenciamento e foi subclonado no vetor binário pPZP201-BK, gerando o vetor binário p Δ chi3.

A Agro-transformação utilizando a linhagem selvagem de *M. anisopliae* e um transformante de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário p Δ chi3 resultaram no isolamento de 119 colônias resistentes ao glifosinato de amônio. A análise do padrão de hibridização no genoma (*Southern blot*) da presença do cassete de inserção Δ chi3-*bar*^R confirmou o genótipo esperado em dois entre 24 transformantes analisados. Utilizando como sonda um fragmento de DNA correspondente à porção 3' da região codificante do gene *chi3* (Figura 5.5 – amplicon 3chi3F + 3chi3R) em amostras de DNA digeridas com a enzima de restrição EcoRV, a linhagem selvagem apresentou apenas um sinal de hibridização com cerca de 4,5 kb. Dois transformantes (tDCHI3_75 e tDCHI3_77) apresentaram sinal de hibridização de cerca de 5,5 kb, confirmando a conversão gênica no *locus* do gene *chi3* para Δ chi3-*bar*^R. O transformante tDCHI3_70 apresentou ambos os sinais de hibridização, sugerindo a integração ectópica do cassete de inativação Δ chi3-*bar*^R (Figura 5.7A).

A inativação do gene *chi3* nos transformantes tDCHI3_75 e tDCHI3_77 foi também confirmada pela análise dos transcritos do gene *chi3*, em comparação com a linhagem selvagem e com o transformante tDCHI3_70 (ectópico). RNA total foi extraído do cultivo destes transformantes e da linhagem selvagem em meio indutor da expressão da quitinase CHIT30 – MM + 1% quitina cristalina (SILVA ET AL., 2005). Após o tratamento com DNase e a síntese de cDNA foi procedido PCR utilizando *primers* para gerar um amplicon correspondente a região codificante do gene *chi3* (amplicon 3chi3F + 3chi3R, ver Figura 5.5). A inativação do gene *chi3* foi confirmada nos transformantes tDCHI3_75 e tDCHI3_77 (Figura 5.5B), pois o amplicon somente foi detectado na linhagem selvagem e no transformante tDCHI3_70 (ectópico).

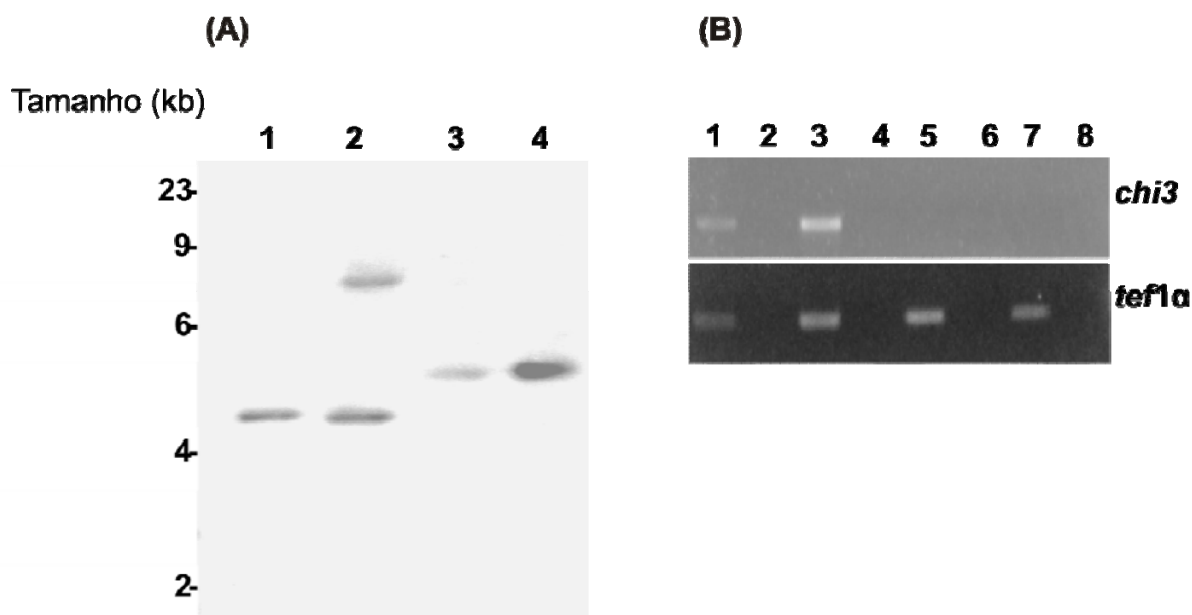


Figura 5.7: Construção de mutantes com inativação do gene *chi3*. Confirmação da conversão gênica no *locus* do gene *chi3* por *Southern blot* (A) e por RT-PCR (B). Em (A) amostras de DNA da linhagem selvagem (1), e dos transformantes tDCHI3_70 (ectópico) (2), tDCHI3_75 (3) e tDCHI3_77 (4) foram digeridas com a enzima EcoRV e hibridizadas contra uma sonda correspondente à parte da região codificante (amplicon 3chi3F + 3chi3R, ver Figura 5.5). Os números à esquerda representam os tamanhos do marcador. A análise dos transcritos por RT-PCR foi realizada a partir de RNA isolado da linhagem selvagem (canaletas 1 e 2), e dos transformantes tDCHI3_70 (ectópico) (canaletas 3 e 4), tDCHI3_75 (canaletas 5 e 6) e tDCHI3_77 (canaletas 7 e 8). As canaletas pares representam as reações controle sem a adição de transcriptase reversa. No gel superior (*chi3*) estão representados os amplicons dos transcritos do gene *chi3* e no gel inferior (*tef1α*), os amplicons dos transcritos do gene *tef1α* usado como normalizador da quantidade de RNA adicionada à reação.

5.3.4. Caracterização fenotípica dos mutantes $\Delta chi3$

As quitinases podem desempenhar diversas funções em fungos filamentosos, podendo ser divididas em dois grandes grupos: a aquisição de nutrientes / infecção e a morfogênese durante o crescimento das hifas e nos processos de diferenciação celular (DUO-CHUAN, 2006). Assim, para identificar funcionalmente o gene *chi3* foram desenvolvidos experimentos que pudessem evidenciar alterações fenotípicas no mutante $\Delta chi3$ nestes dois grandes grupos funcionais das quitinases.

Para avaliar o envolvimento da quitinase CHIT30 na morfogênese, diluições seriadas de esporos da linhagem selvagem e do mutante $\Delta chi3$ tDCHI3_75 (definido como representante e utilizado nos demais experimentos, sendo doravante denominado $\Delta chi3$), foram inoculados em diferentes meios de cultivo contendo os agentes desestabilizadores da parede celular *calcofluor white* (CF) e *congo red* (CR). Ambos os compostos interferem na síntese da parede celular, pois interagem com fibras de quitina. Portanto, mutantes com defeitos na síntese da parede celular são mais sensíveis a estes compostos (RAM & KLIS, 2006). O ensaio com o mutante $\Delta chi3$ não revelou alterações significativas tanto de desenvolvimento quanto de esporulação em relação à linhagem selvagem (Tabela 5.3), sugerindo que a quitinase CHIT30 não está envolvida no desenvolvimento da hifa em condições normais de cultivo.

Tabela 5.3: Susceptibilidade das linhagens selvagem e $\Delta chi3$ a agentes desestabilizadores de parede celular.

Linhagem	WT				$\Delta chi3$				
	Composto	CF ($\mu\text{g/mL}$)		CR ($\mu\text{g/mL}$)		CF ($\mu\text{g/mL}$)		CR ($\mu\text{g/mL}$)	
		10	100	10	100	10	100	10	100
Quantidade de Esporos									
10^5		++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	+++
10^4		+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
10^3		++	+	++	+	++	+	++	+
10^2		+	-	+	-	+	-	+	-

WT, linhagem selvagem E6; $\Delta chi3$, mutante inativo para o gene *chi3*; CF, calcofluor White; CR, congo red. (++++), desenvolvimento normal com esporulação em toda superfície da colônia; (+++), desenvolvimento normal com esporulação em cerca de 50% da colônia; (++) , desenvolvimento normal sem esporulação; (+), pouco desenvolvimento; (-) sem desenvolvimento.

O possível envolvimento da quitinase CHIT30 na morfogênese também foi avaliado analisando a cinética da divisão celular, a qual é caracterizada pelo balanço da atividade enzimática entre quitina sintases e quitinases (ADAMS, 2004). Esporos da linhagem

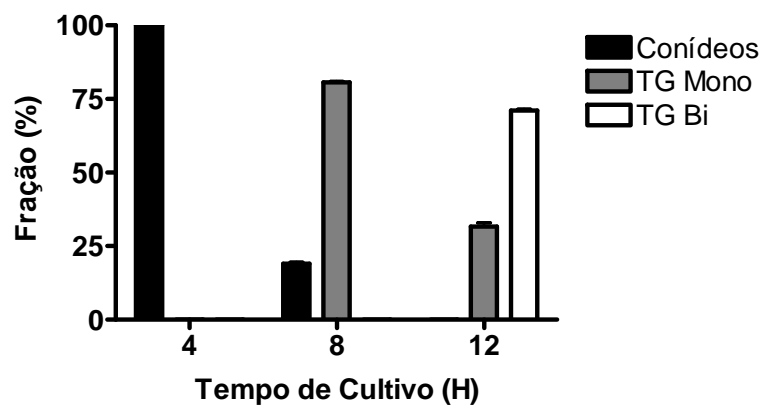
selvagem e do mutante Δ chi3 foram inoculados separadamente em meio mínimo e germinados sobre lamínulas por períodos crescentes de tempo. O número de núcleos presentes em cada conídeo ou aqueles com formação de tubo germinativo foi avaliado por coloração com DAPI e visualização em microscópio de fluorescência. Após 4 horas de cultivo, ocorreu a formação de tubos germinativos em ambas as linhagens, sendo observado apenas um núcleo por célula. Após 8 horas de cultivo, ocorreu pelo menos um evento de mitose, evidenciado pela presença de dois núcleos na maioria das células analisadas. Tanto para a linhagem selvagem (Figura 5.8A) quanto para o mutante Δ chi3 (Figura 5.8B), não foi detectada diferença no número de núcleos nas condições do experimento. Este dado corroborou a sugestão anterior de que a quitinase CHIT30 não está envolvida no desenvolvimento do fungo nas condições analisadas.

Tendo em vista que, nestes experimentos, não foram observadas alterações fenotípicas ligadas ao desenvolvimento celular na linhagem Δ chi3 em relação à linhagem E6, foram realizados experimentos para averiguar o papel da quitinase CHIT30 na aquisição de nutrientes e/ou patogenicidade. Inicialmente, cultivos das linhagens selvagem ou Δ chi3 foram realizados em meio mínimo contendo quitina cristalina por distintos períodos de tempo (48, 72, 96 e 120 H), seguidos da determinação da atividade de endoquitinases, exoquitinases e de quitinases totais (obtida pela soma das atividades de endo e exoquitinases) dos sobrenadantes destes cultivos.

A atividade total de quitinases secretadas presente nos sobrenadantes de cultivos das linhagens selvagem e Δ chi3 por 48, 72 e 120 H de incubação foi superior na linhagem mutante. Este efeito pode ser oriundo de um possível efeito compensatório devido à falta da quitinase CHIT30 no mutante Δ chi3. No tempo de 96 H, entretanto, houve semelhança nas atividades de quitinases totais nos sobrenadantes de cultivos das duas linhagens, a selvagem e

a Δchi3 (Figura 5.9A). A análise isolada de endoquitinases (Figura 5.9B) e exoquitinases (Figura 5.9C) revelou um padrão semelhante à de quitinases totais presentes nos sobrenadantes de cultivos das linhagens selvagem e Δchi3 .

(A)



(B)

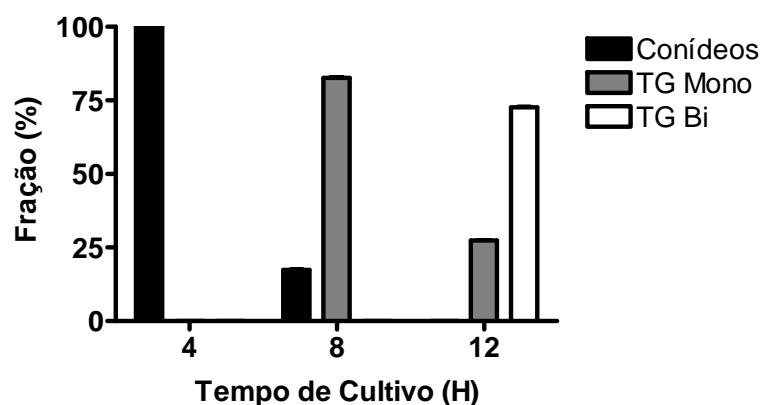
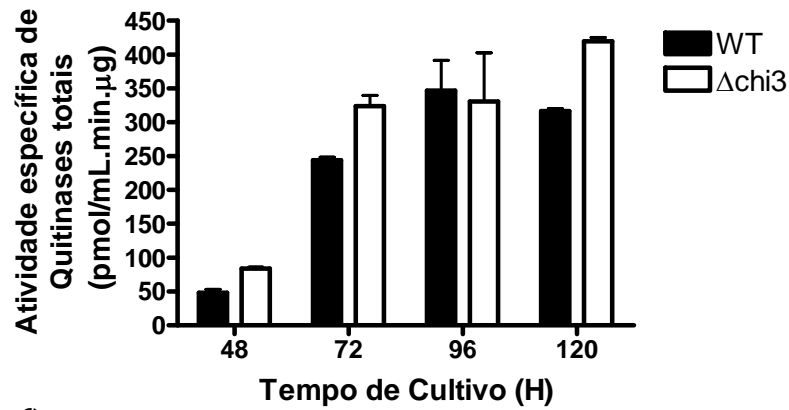


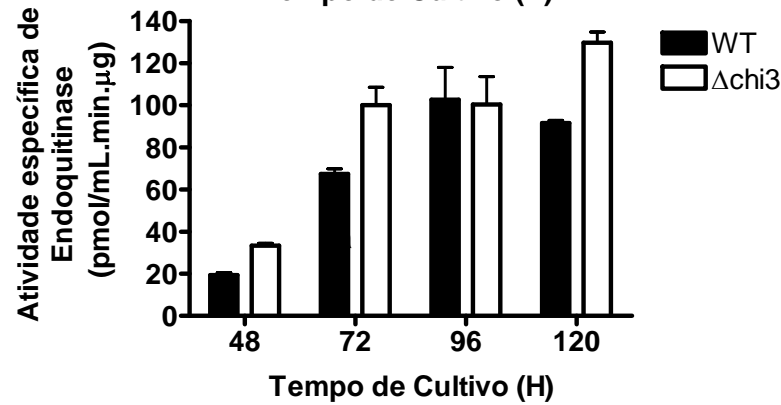
Figura 5.8: Cinética nuclear de *M. anisopliae* em MC em distintos períodos de tempo. Cultivos das linhagens E6 (A) e a Δchi3 (B) foram avaliados quanto ao número de núcleos presentes nos conídeos e em tubos germinativos (TG), podendo ser classificados como mono ou binucleados.

Apesar da possível participação da quitinase CHIT30 na aquisição de nutrientes, a sua ausência parece não acarretar em perda de desempenho na hidrólise de quitina presente no meio de cultivo, não sendo essencial para tal propósito.

(A)



(B)



(C)

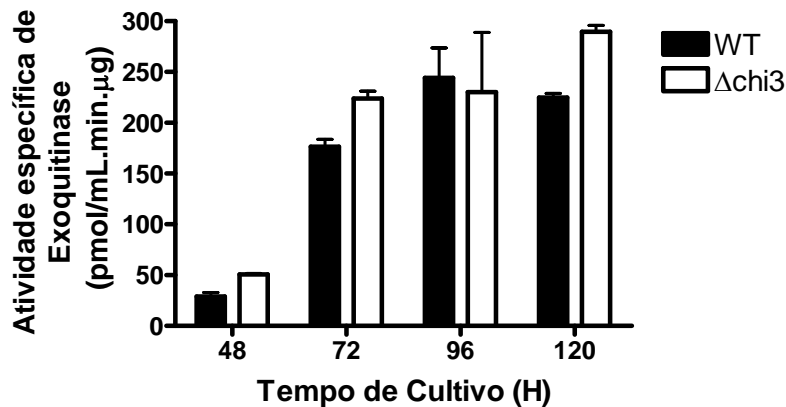


Figura 5.9: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas secretadas pelas linhagens selvagem (WT) e mutante Δ chi3 em diferentes períodos de tempo. Ensaio para avaliação da quitinases totais (A), endoquitinases (B) e exoquitinases (C) em sobrenadantes de cultivo em distintos períodos de incubação de três experimentos independentes.

Em decorrência do padrão diferenciado da atividade de quitinases em sobrenadantes de cultivo, foi avaliado o potencial patogênico da linhagem Δ chi3 em comparação ao da

linhagem WT no hospedeiro modelo *D. peruvianus*. Estes ensaios foram realizados de acordo com protocolos já definidos no laboratório (L. SANTI, Doutorando PPGBCM, comunicação pessoal). Foram utilizados grupos de 15 animais adultos machos por grupo e expostos a conídeos da linhagem selvagem ou do mutante Δ chi3. O número de insetos de três experimentos independentes foi avaliado e utilizado no cálculo do TL50. Em até 10 dias, a linhagem selvagem causou a morte de todos os insetos. O mutante Δ chi3, por sua vez, causou uma mortalidade de cerca de 10 % menor (Tabela 5.4). A análise para a determinação do tempo mediano de morte (LT50) revelou um valor ligeiramente menor para a linhagem selvagem em relação ao mutante Δ chi3 (Tabela 5.4), sugerindo que a ausência da quitinase CHIT30 no mutante Δ chi3 seja responsável pela diminuição da sua virulência. A Figura 5.10 mostra uma curva de mortalidade do inseto comparando a linhagem selvagem com o mutante Δ chi3.

Tabela 5.4: Mortalidade de *D. peruvianus* sobre efeito da linhagem selvagem (WT) e do mutante Δ chi3.

Linhagem	Mortalidade (%)^a	TL₅₀ (dias)	Limites Fiduciais 95% (dias)
WT	100 ± 0	6,17	5,82 – 6,52
Δ chi3	86,67 ± 6,67	8,49	8,12 – 8,92

^a Número de insetos mortos após 10 dias do início do bioensaio.

A expressão do gene *chi3* em condições de estresse térmico no fungo *M. anisopliae*, sugere um efeito da quitinase CHIT30 na adaptação ou na recuperação do fungo a variações de temperatura. Esta pode ser uma estratégia do fungo para sobrepujar a termo regulação comportamental, mecanismo de defesa desenvolvido pelos insetos que leva ao aumento da temperatura corpórea visando diminuir a viabilidade dos patógenos (OUEDRAOGO *ET AL.*, 2003; OUEDRAOGO *ET AL.*, 2004). Para avaliar se a atividade da quitinase CHIT30 está envolvida na resposta à termo-regulação comportamental, foram realizados experimentos de

choque térmico com conídios germinados da linhagem selvagem e do mutante Δchi3 . Após um período de germinação de 20 H em meio de cultura sólido MC, os conídios germinados foram transferidos para o meio MM e submetidos a um choque térmico de 42 °C por 2, 4 ou 6 H. O número de sobreviventes foi avaliado após transferência dos esporos germinados para meio de cultura completo (MC) e incubação à temperatura de 28 °C por até cinco dias. Ocorreu um decréscimo na viabilidade dos esporos geminados após o choque térmico tanto na linhagem selvagem quanto no mutante Δchi3 , sendo bastante evidente mesmo nas primeiras duas primeiras horas de choque térmico, onde ocorreu um decréscimo de cerca de 90 % na viabilidade das duas linhagens analisadas (Figura 5.11). Para tempos maiores de choque térmico, a viabilidade diminuiu 100%.

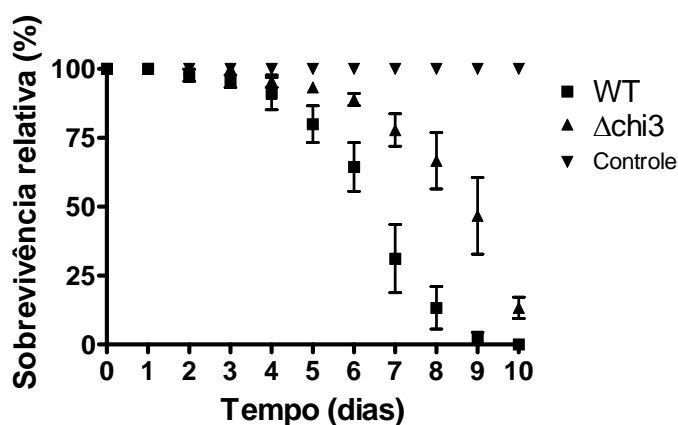


Figura 5.10: Mortalidade de *D. peruvianus* sobre efeito da linhagem selvagem (WT) e do mutante Δchi3 . Ensaio para determinação da mortalidade de *D. peruvianus* à diferentes linhagens de *M. anisopliae* (10^8 esporos/mL) segundo o tempo.

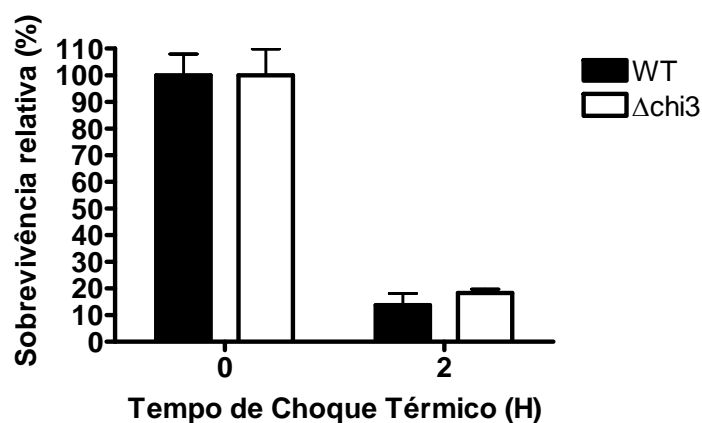


Figura 5.11: Sobrevivência de conídeos germinados das linhagens ao choque térmico.

Ensaio para determinação da viabilidade de esporos germinados expostos a um tratamento de duas horas à temperatura de 42 °C. As barras representam a média, de três experimentos independentes, da viabilidade relativa ao controle sem choque térmico,

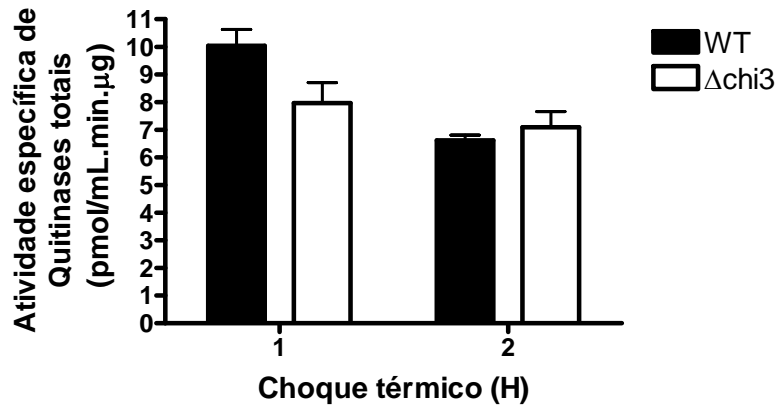
Em decorrência da mesma sensibilidade de tubos germinativos das linhagens selvagem e mutante Δ chi3 ao choque térmico, demonstrando que a quitinase CHIT30 não é essencial para a recuperação do choque térmico, outro experimento foi realizado para obter mais informações sobre a possível função desta enzima durante a exposição ao estresse por alta temperatura. Micélio obtido de um pré-cultivo em meio Sabouraud, lavado e submetido ao choque térmico por 1 ou 2 H em MM foi analisado quanto à atividade de quitinase presente nas porções intracelulares e associadas à parede celular, bem como aquelas presentes nos sobrenadantes do meio de cultivo.

A atividade total de quitinases presentes na fração intracelular e naquela associada à parede celular após 1 H de choque térmico apresentou uma diminuição de cerca de 20 % no mutante Δ chi3 em relação à linhagem selvagem. Já após 2 H, não havia diferença entre a atividade total de quitinases entre as duas linhagens (Figura 5.12A). Analisadas separadamente, a atividade de endoquitinases não apresentou alterações no mutante Δ chi3 em relação à linhagem selvagem, tanto no tempo de 1 H quanto de 2 H de choque térmico (Figura

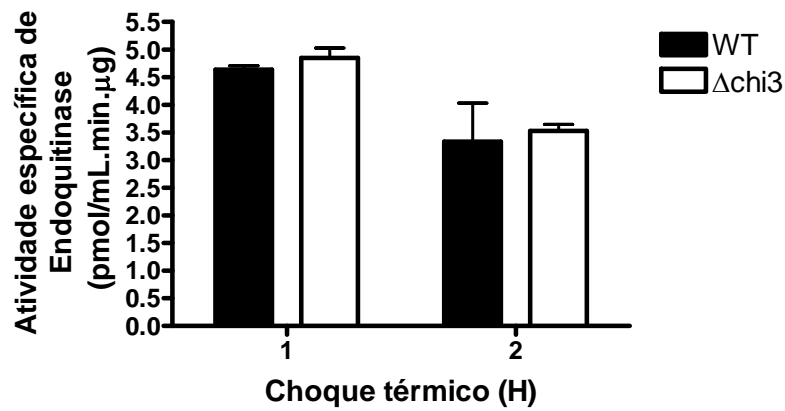
5.12B). A atividade de exoquitinases diminuiu à metade no tempo de 1 H de choque térmico. Já em 2 H, não houve diferença na atividade de exoquitinases (Figura 5.12C).

A atividade secretada de quitinases, por sua vez, também diferiu entre as linhagens selvagem e Δchi3 . A atividade total é cerca de 50 % maior na linhagem selvagem após o período de 1 H de estresse térmico em relação à Δchi3 e 20 % maior após 2 H (Figura 5.13A). A análise de cada classe (endo e exoquitinases) revelou um padrão semelhante, sendo a atividade da linhagem selvagem maior em relação ao mutante Δchi3 após 1 H de choque térmico, tanto para endoquitinases (Figura 5.13B), quanto para exoquitinases (Figura 5.13C). A análise destes resultados aponta para a possível funcionalidade da quitinase CHIT30 na reestruturação das hifas ao choque térmico.

(A)



(B)



(C)

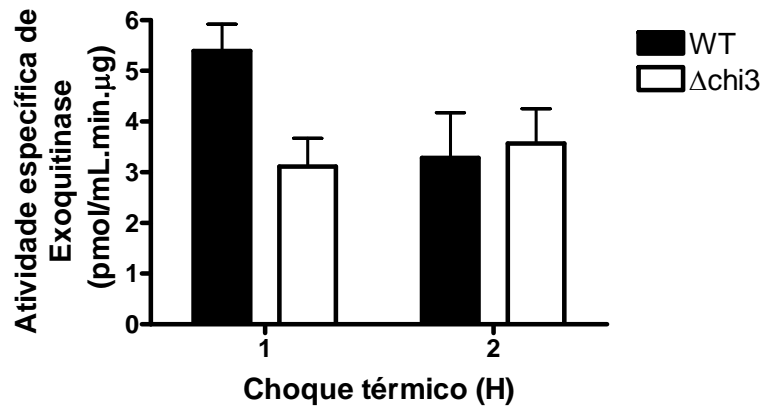
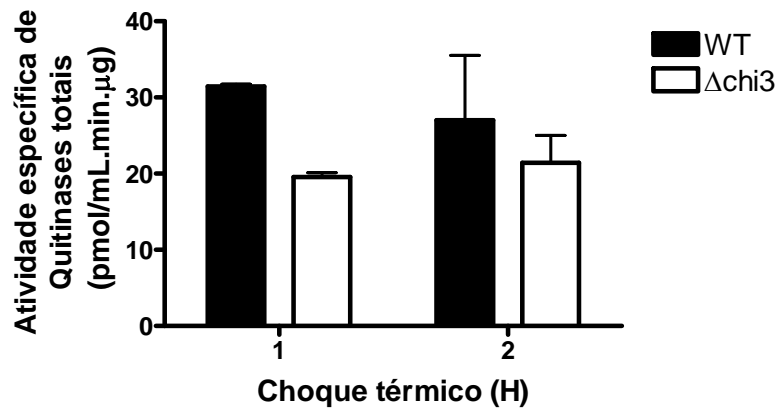
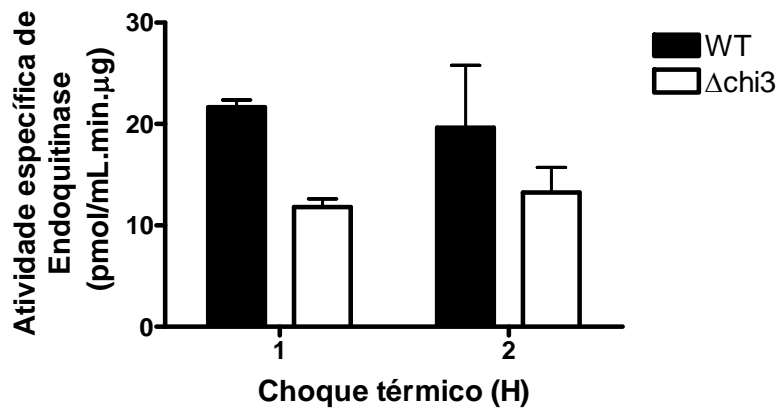


Figura 5.12: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas intracelulares das linhagens selvagem (WT) e mutante Δ chi3 após diferentes períodos de estresse térmico. Ensaio para a avaliação da atividade de quitinases totais (A), endoquitinases (B) e exoquitinases (C) e realizados em triplicada com amostras provenientes de dois tratamentos independentes.

(A)



(B)



(C)

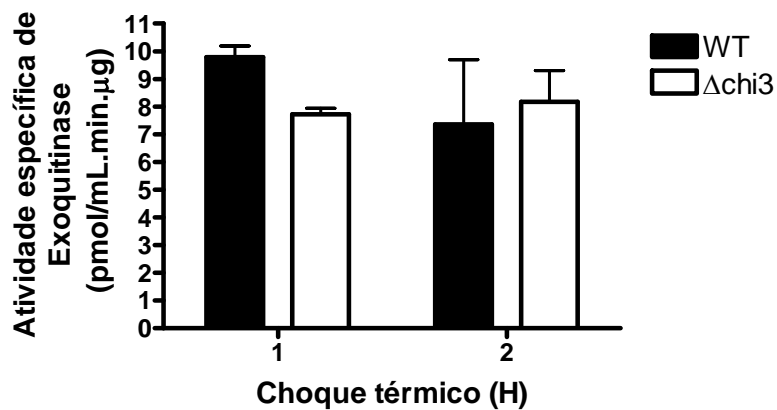


Figura 5.13: Atividade enzimática quitinolítica específica das proteínas secretadas nos sobrenadantes de cultivo pelas linhagens selvagem (WT) e Δ chi3 após diferentes períodos de estresse térmico. Ensaio para a avaliação da atividade de quitinases totais (A), endoquitinases (B) e exoquitinases (C) e realizados em triplicada com amostras provenientes de dois tratamentos independentes.

5.3.5. Construção e caracterização de linhagens para a expressão da fusão CHIT30::GFP

Experimentos prévios de nosso grupo mostraram a presença da quitinase CHIT30 durante o processo de infecção do carrapato *B. microplus* por ensaios de imunolocalização (SILVA ET AL., 2005). Para melhor avaliar a localização sub-celular desta enzima, foi procedida à construção de linhagens de *M. anisopliae* com um cassete para a expressão de uma forma de fusão da quitinase CHIT30 com a proteína repórter GFP.

Foi construído um vetor binário, denominado pchi3gfp, que possui um o gene *chi3* fusionado, em sua extremidade carbóxi-terminal, à ORF do gene *sgfp* (FERNANDEZ-ABALOS ET AL., 1998). Nesta construção, foi adicionado o cassete para expressão da resistência a glifosinato de amônio (*bar^R*, Figura 5.1) flanqueando o cassete *chi3::gfp*. Um esquema mostrando a construção deste vetor binário com a etiqueta GFP está representado na Figura 5.2.

O T-DNA do vetor binário pchi3gfp foi transferido para *M. anisopliae* por Agro-transformação. Para a seleção dos transformantes, foi utilizada a resistência a glifosinato de amônio. Cerca de 40 transformantes foram isolados e como triagem inicial para a seleção de transformantes expressando a quitinase CHIT30 marcada com GFP, a expressão de fluorescência verde foi avaliada por microscopia confocal em condições de indução da expressão de quitinases (meio mínimo acrescido de extrato de levedura à 0,05% e quitina coloidal à 1% cultivado por 48 H). As extremidades das hifas de dois transformantes (tFPC7.5 e tFPC7.7) exibiram fluorescência verde. Esta fluorescência estava espalhada no interior das hifas, podendo ser detectada até a extremidade da hifa. Esta fluorescência, por sua vez, não foi detectada na linhagem selvagem, o que sugere a expressão da fusão CHIT30::GFP (Figura 5.14)

O padrão de inserção no genoma da construção presente no vetor binário *pchi3gfp* foi analisado por experimentos de *Southern blot*. Quando utilizado como sonda um fragmento de DNA correspondente à região codificante do gene *chi3* (amplicon 3chi3F + 3chi3R, Figura 5.5), foi detectado apenas um sinal de hibridização na linhagem selvagem, ao passo que nos transformantes tFPC7.5 e tFPC7.7 foram detectados dois sinais de hibridização, sendo o de menor tamanho molecular correspondente ao *locus* selvagem do gene *chi3*. Os sinais de hibridização de maior tamanho molecular correspondem aos sítios de integração ectópica nos dois transformantes, respectivamente (Figura 5.15A).

Para avaliar se nos transformantes para a expressão da fusão CHIT30::GFP ocorria a expressão da proteína de fusão, foram realizados experimentos de *Western blot* para reconhecimento tanto da quitinase CHIT30 quanto da proteína repórter GFP. Sobrenadantes de cultivos de 72 h de incubação na presença de quitina cristalina das linhagem selvagem e dos transformantes tFPC7.5 e tFPC7.7 foram concentrados e submetidos à análise por *Western blot* utilizando anticorpos anti-CHIT30 (SILVA ET AL., 2005) ou anti-GFP (Invitrogen). No sobrenadante da cultura da linhagem selvagem, foi detectado uma proteína com cerca de 30 kDa utilizando o anticorpo anti-CHIT30, como descrito (SILVA ET AL., 2005) e não houve reconhecimento por parte do anticorpo anti-GFP, como esperado (Figura 5.15B).

Nos sobrenadantes das culturas de dois transformantes analisados, foi detectada reação com o anticorpo anti-CHIT30 com um sinal de cerca de 20 kDa e não de 57 kDa, massa molecular predita da fusão CHIT30::GFP, como previsto. Além disso, não foi detectada a reação com o anticorpo anti-GFP (Figura 5.15B), embora a análise por microscopia confocal tenha detectado emissão de fluorescência de GFP nestes transformantes.. Uma análise *in silico* da seqüência primária de aminoácidos da proteína de fusão CHIT30::GFP predita

revelou a presença de inúmeros sítios para proteases, o que pode significar a proteólise da proteína de fusão nos sobrenadantes analisados. É conhecida a indução de proteases por quitina cristalina em culturas de *M. anisopliae* (MORAES ET AL., 2003).

Para tentar obter mais informações para elucidar a função da quitinases CHIT30, foram também realizados experimentos para determinar com maior exatidão a localização subcelular desta proteína. Para tal, utilizamos a linhagem para expressão da fusão CHIT30::GFP tFPC7.5 (utilizada como representante nos experimentos descritos a partir deste ponto e sendo doravante denominada chi3gfp) em experimentos de indução de quitinases por diferentes períodos de tempo. Esporos da linhagem chi3gfp foram incubados em quitina coloidal a 1% ou NAG a 0,2% e cultivados à temperatura de 28 °C por diferentes períodos de tempo (24, 32 ou 40 H para NAG e 24, 32, 40, 48 ou 52 H para quitina coloidal) e analisados por microscopia confocal de fluorescência.

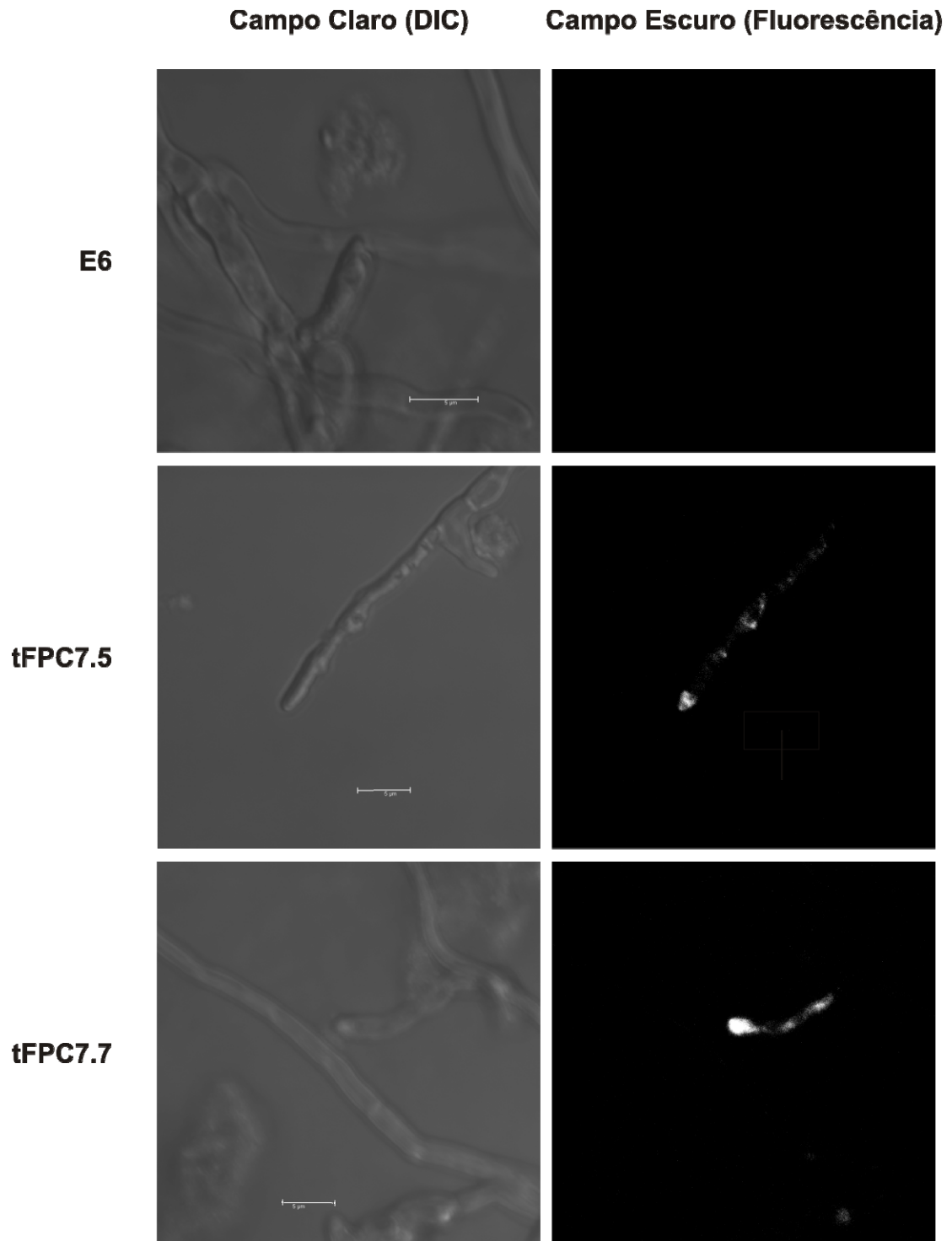


Figura 5.14: Fenótipo dos transformantes para expressão da fusão CHIT30::GFP visualizados por microscopia confocal. Ocorre acúmulo de fluorescência verde nas extremidades das hifas. Painel à esquerda mostra a microscopia diferencial de contraste de interferência (DIC) e o painel à direita a microscopia de fluorescência. O painel superior representa a linhagem selvagem e o painel do meio e o inferior, as linhagens tFPC7.5 e tFPC7.7, respectivamente. A barra nas figuras representa um tamanho de 5 µm.

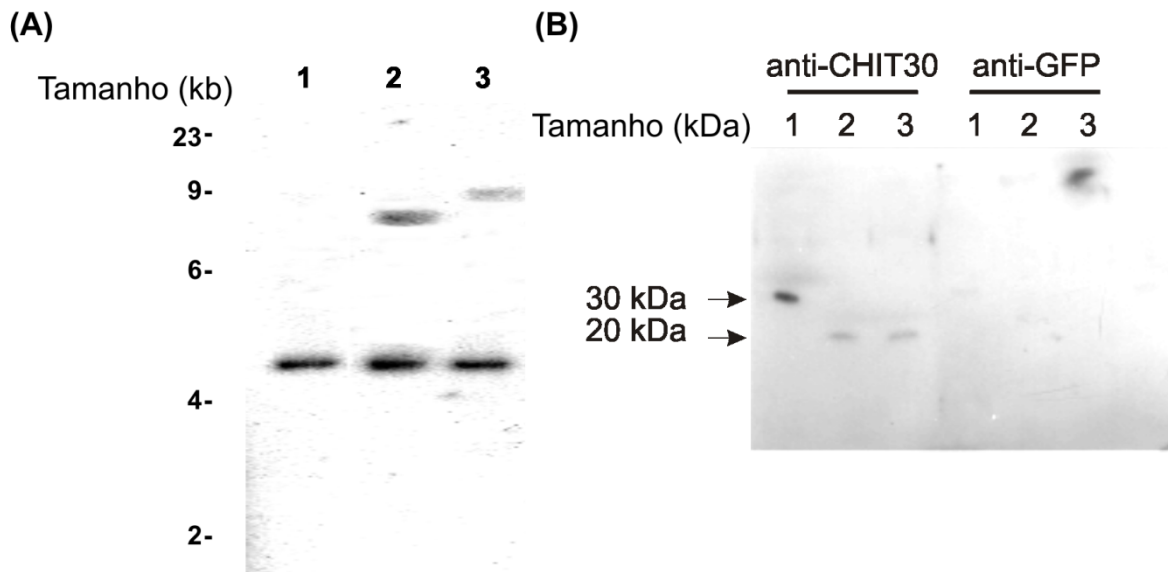


Figura 5.15: Detecção da proteína de fusão CHIT30::GFP. Confirmação da integração do cassete para a expressão da fusão CHIT30::GFP por *Southern blot* (A) e avaliação da proteína recombinante por *Western blot* (B). Amostras de DNA da linhagem selvagem (canaleta 1), e dos transformantes tFPC7.5 (canaleta 2) e tFPC7.7 (canaleta 3) foram digeridas com a enzima EcoRV e hibridizadas contra uma sonda correspondente à parte da região codificante do gene *chi3*. Os números à esquerda representam os tamanhos do marcador. A análise por *Western blot* foi realizada a partir de sobrenadantes de cultivo da linhagem selvagem (canaleta 1) e dos transformantes tFPC7.5 (canaleta 2) e tFPC7.7 (canaleta 3). As análises foram realizadas com os anticorpos anti-CHIT30 (painel anti-CHIT30) ou anti-GFP (painel anti-GFP). Os números à esquerda representam o tamanho aproximado das proteínas baseado no marcador de massa molecular BenchMark™ Ladder (Invitrogen).

Quando cultivado no indutor NAG, parece haver uma concentração das áreas com fluorescência na extremidade da hifa. No período de 24 H de incubação, foi detectada a fluorescência em pequenos focos no tubo germinativo, enquanto após 32 H de incubação, ocorreu uma concentração da fluorescência na extremidade distal do tubo germinativo. Esta concentração da fluorescência diminuiu no cultivo de 40 H de incubação (Figura 5.16). Estes resultados sugerem que o indutor NAG está sendo consumido e de fato induzindo a produção da proteína de fusão CHIT30::GFP, que provavelmente está sendo processada e direcionada para a secreção. Entretanto, com o decorrer do cultivo, e conseqüente escassez de NAG no

meio de cultivo, a expressão do gene *chi3* cessa. Além disso, não ocorre indução da expressão do gene *chi3* em condições de privação de nutrientes, como confirmado pelo padrão de expressão do gene *chi3* na linhagem selvagem (ver Figura 5.6). O padrão de expressão do gene obtido por qRT-PCR confirma os resultados da análise do transformante CHIT30::GFP por microscopia confocal. A localização concentrada da fluorescência na extremidade da hifa pode ainda contribuir para o desenvolvimento da mesma, local de intensa atividade de quitinases e quitina sintases, as quais propiciam o crescimento da hifa. Essa possível contribuição da quitinase CHIT30 parece não ser fundamental para o crescimento do fungo, devido ao fato de mutantes nulos deste gene não apresentam deficiências de desenvolvimento nas condições analisadas.

A análise dos cultivos em quitina coloidal por microscopia confocal revelou uma complexidade na localização da proteína de fusão CHIT30::GFP. Em até 24 H de cultivo, não foi detectada a fluorescência, indicando que possivelmente não ocorre a expressão da fusão CHIT30::GFP. Em 32 H de cultivo, tubos germinativos apresentam intensa fluorescência nas regiões da parede celular das hifas, principalmente na extremidade distal do tubo germinativo. Esta localização também é observada nos tempos de cultivo de 40, 48 e 52 H, sendo bastante evidente a associação entre hifas e partículas de quitina coloidal dispersas no meio. (Figura 5.17). A localização da proteína de fusão na parede celular pode estar associada à sua liberação no meio extracelular para degradação da quitina disponível.

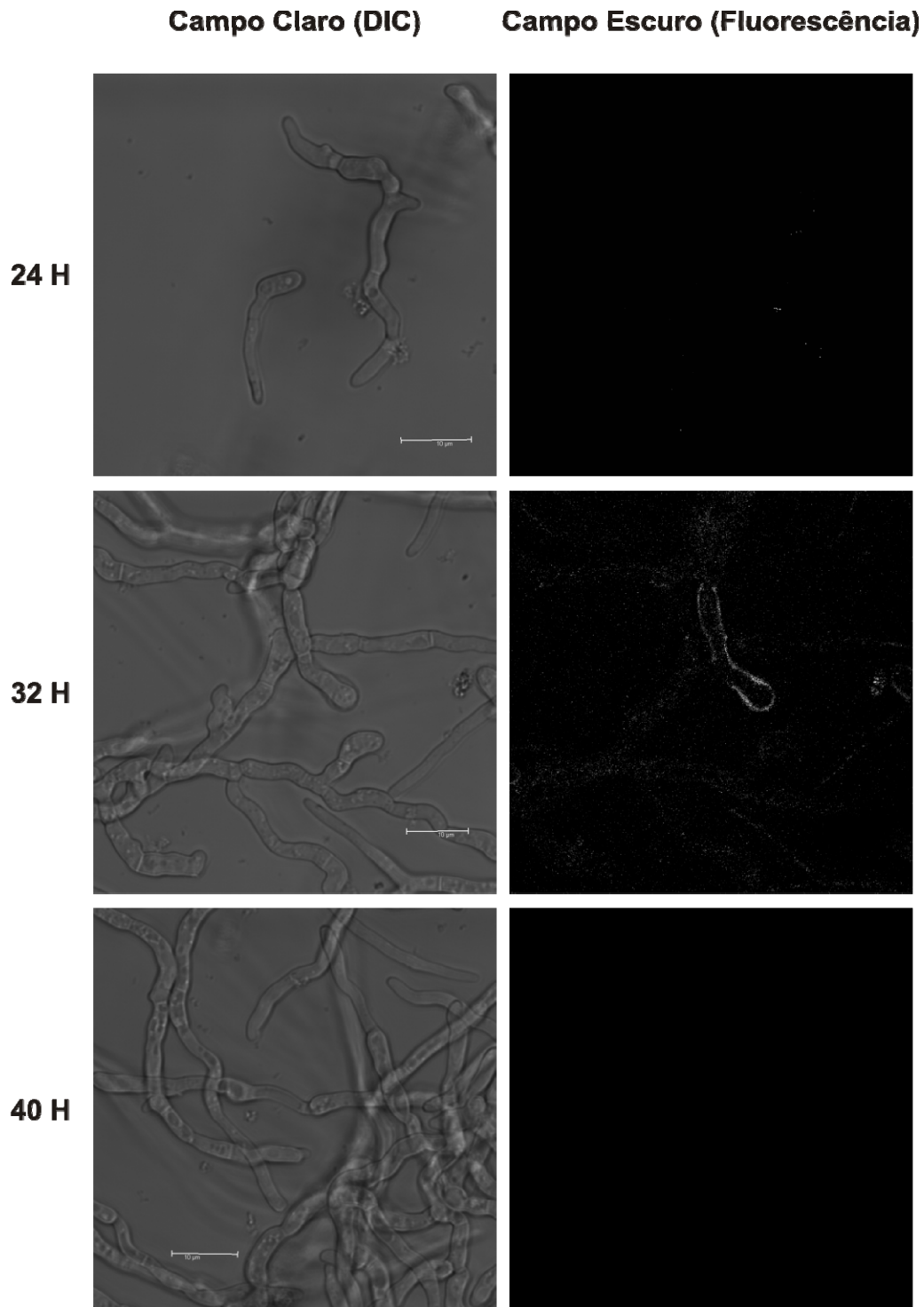


Figura 5.16: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem *fuschi3* em presença de NAG. Painel à esquerda mostra a microscopia diferencial de contraste de interferência (DIC) e o painel à direita a microscopia de fluorescência. O painéis superior, mediano e inferior representam os tempos de incubação de 24, 32 e 40 H, respectivamente. A barra nas figuras representa um tamanho de 10 μm .

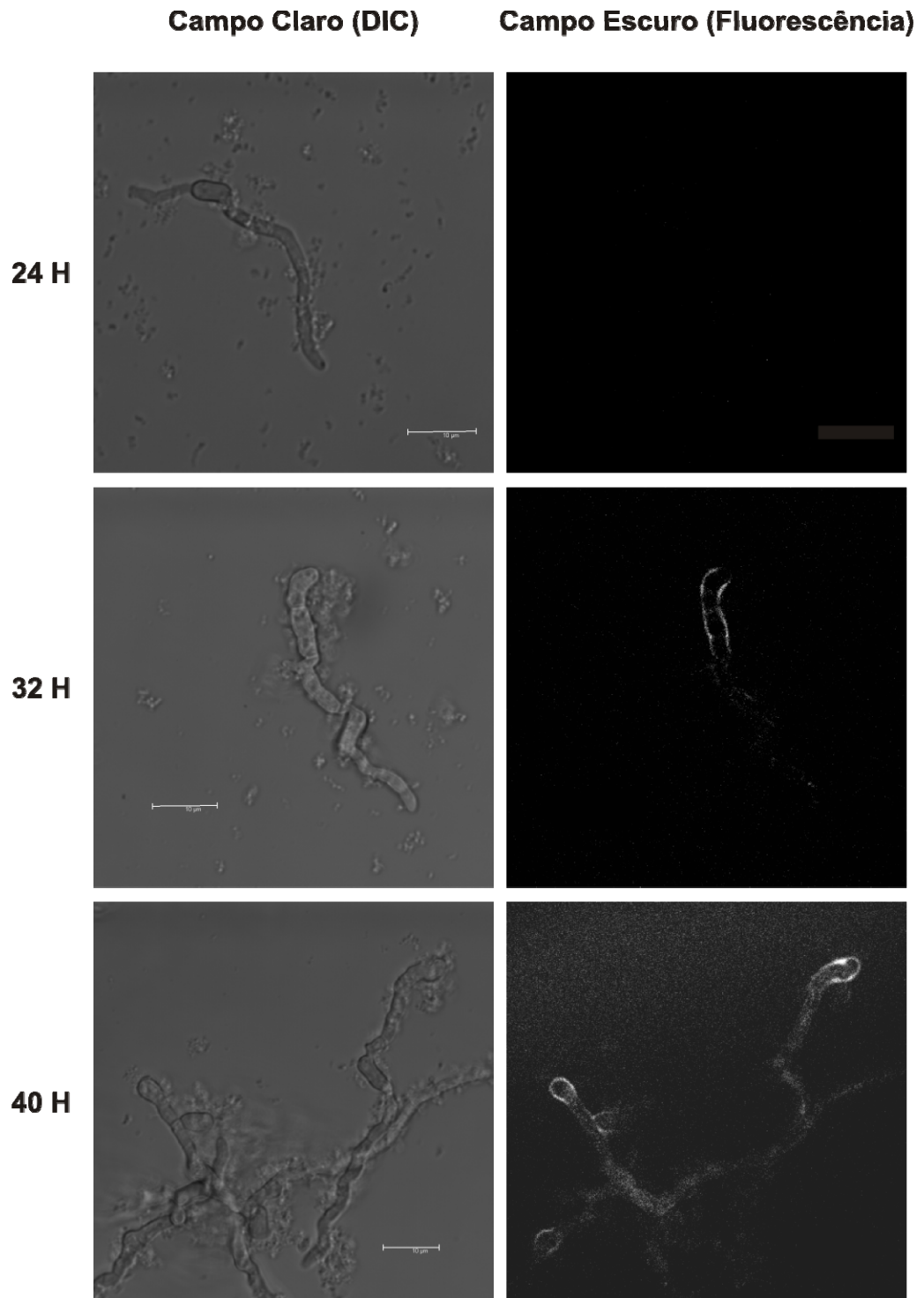


Figura 5.17: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem fuschi3 em presença de quitina coloidal. Painel à esquerda mostra a microscopia diferencial de contraste de interferência (DIC) e o painel à direita a microscopia de fluorescência. O painéis representam os tempos de incubação de 24, 32 e 40, 48 e 56 H. A barra nas figuras representa um tamanho de 10 μm .

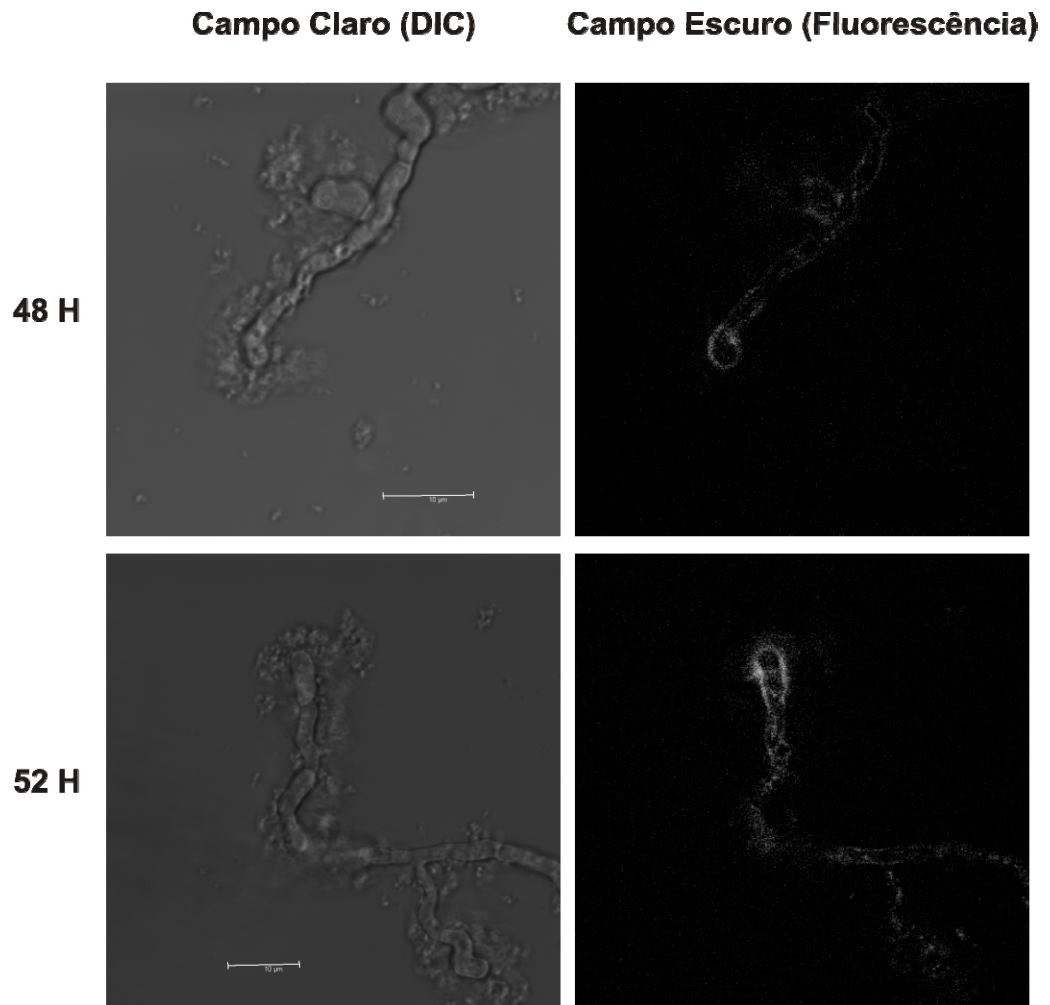


Figura 5.17: Padrão de expressão e localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na linhagem fuschi3 em presença de quitina coloidal (continuação)

5.4. DISCUSSÃO

O fungo filamentosso *M. anisopliae* têm despertado interesse por sua grande amplitude de hospedeiros alvos, incluindo insetos e ácaros de interesse médico e agropecuário. Esta diversidade é a base para diversos estudos que levam à construção de um modelo de estudo de biologia molecular e bioquímica das interações patógeno-hospedeiro (ROBERTS & ST. LEGER, 2001).

Embora quitina, proteínas e lipídeos sejam os constituintes majoritários e comuns às cutículas de artrópodes (ANDERSEN, 1979; ARRUDA *ET AL.*, 2005), o fungo não é capaz de infectar indiscriminadamente. Durante a sua evolução, este fungo desenvolveu estratégias de infecção que refletem a complexidade de seus hospedeiros e que são a base da sua especificidade. Diferentes isolados do fungo apresentam diferentes potencialidades de infecção e possuem hospedeiros preferenciais. Isto é reflexo da possível capacidade diferencial de secreção de hidrolases (quitinases, proteases e lipases) que atuam de forma sinérgica para transpor a barreira da cutícula com o início da infecção.

Análises de ESTs, provenientes de RNAs extraídos de cultivos que mimetizavam a infecção, permitiram a descrição de uma família gênica constituindo por 11 membros de uma classe específica de proteases, as subtilisinas (BAGGA *ET AL.*, 2004). É possível que ocorra expressão diferencial destas subtilisinas conforme o hospedeiro sendo infectado. A protease Pr1A é um conhecido fator de patogenicidade de *M. anisopliae* para larvas de *M. sexta*, ao passo que não parece ser para o carrapato *B. microplus*. Análises de genes diferencialmente expressos apontam para a protease Pr1C como possível fator de patogenicidade no carrapato (DUTRA *ET AL.*, 2004; FRANCESCHINI, 2005; ST. LEGER *ET AL.*, 1996c).

As quitinases também parecem ser importantes para a patogenicidade de *M. anisopliae*. Durante a infecção, pelo menos duas quitinases são secretadas: CHIT43,5 e

CHIT30 (SILVA *ET AL.*, 2005; ST. LEGER *ET AL.*, 1996b). Entretanto, o fungo é capaz de secretar pelo menos seis isoformas de quitinases quando cultivado em meio contendo quitina cristalina como única fonte de carbono (SILVA *ET AL.*, 2005). Acredita-se que ocorra certa seletividade na secreção de quitinases conforme o hospedeiro, entretanto ainda não existe confirmação experimental.

Com o advento de projetos genoma, está sendo possível compreender melhor o sistema quitinolítico de fungos filamentosos, que se tem mostrado mais complexo e diversificado de que o antecipado. Para o fungo micopatogênico *T. reesei*, 18 genes para quitinases foram descritos no genoma (SEIDL *ET AL.*, 2005). Há demonstrações de que algumas destas quitinases são determinantes de patogenicidade, por exemplo, os genes *ech42* (CARSOLIO *ET AL.*, 1999) e *chit33* (LIMÓN *ET AL.*, 1999). A diversidade de genes de quitinases para esta espécie é provavelmente devido à alta concentração de quitina nos hospedeiros de *Trichoderma* sp. Outra espécie em que foi realizada a procura de seqüências de genes de quitinases no genoma foi o fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*. Foram identificados 14 possíveis genes para quitinases *in silico*, sendo quatro deles pertencentes à classe planta / fungo e o restante pertencente à classe bactéria/ fungo (TAIB *ET AL.*, 2005).

O grande número de genes de quitinase em fungos filamentosos pode ter sido originado para propiciar um controle bastante preciso das duas funções básicas destas enzimas nestes organismos: (i) no remodelamento da parede celular, sítio de intensa deposição de quitina, propiciando o crescimento celular pela extensão das hifas, a liberação de conídios e a diferenciação celular e (ii) na nutrição, pela hidrólise de quitina exógena (DUO-CHUAN *ET AL.*, 2006).

A quitinase CHIT30 de *M. anisopliae* foi a primeira descrita a possuir ambas as atividades de endo e exoquitinase na mesma proteína (PINTO *ET AL.*, 1997). Esta

característica foi posteriormente descrita também para uma quitinase com massa aproximada de 46 kDa de *A. fumigatus* (XIA ET AL., 2001) e para a quitinase B da bactéria marinha *Microbulbifer degradans* (HOWARD ET AL., 2004). Um estudo foi realizado para caracterizar funcionalmente a quitinase B de *M. degradans*. As duas atividades são oriundas de dois domínios existentes nas extremidades amino-terminal (exoquitinase) e carbóxi-terminal (endoquitinase) da proteína, separados por domínios poli-serina. Os dois domínios funcionam de maneira independente (HOWARD ET AL., 2004). Não há descrição do mesmo padrão de organização nas quitinases bifuncionais de *A. fumigatus* e de *M. anisopliae*. No presente trabalho, uma análise *in silico* no banco de dados Pfam (BATEMAN ET AL., 2004) com a seqüência primária deduzida da quitinase CHIT30 revelou a existência de apenas um domínio GH18 (glicosil-hidrolases família 18).

A quitinase CHIT30, devido a sua característica bifuncional e ao fato de ser secretada durante a infecção, o que possivelmente apontaria para um determinante de patogenicidade (PINTO ET AL., 1997, SILVA ET AL., 2005), foi eleita para a caracterização funcional neste trabalho.

Nossa primeira tentativa de caracterização funcional do gene *chi3* se deu pela construção de vetores para a expressão constitutiva do respectivo cDNA do gene *chi3* a partir do promotor forte e constitutivo do gene *gpdA* de *A. nidulans*. Os experimentos de transformação tiveram um rendimento muitas vezes inferior aos rotineiramente realizados no laboratório. Os dez transformantes que foram obtidos apresentavam os mesmos níveis de quitinases secretadas em meio indutor (quitina cristalina) e repressor (glicose) quando comparados à linhagem selvagem. Este fato sugere que os transformantes que produziam constitutivamente a proteína CHIT30 não foram isolados nestes experimentos de

transformação, o que provavelmente se deve a. um possível efeito tóxico da expressão constitutiva da quitinase CHIT30 ao fungo.

A expressão constitutiva do gene *chit1* de *M. anisopliae* acarreta em aumento da expressão de quitinases extracelulares, sem aumento da virulência (SCREEN & ST. LEGER, 2001). A expressão constitutiva do gene *chit2* de *M. anisopliae* está sendo realizado em nosso laboratório e os resultados até o momento obtidos não sugerem efeito tóxico (J. T. BOLDO, Doutorando PPGBCM, comunicação pessoal). Já para o fungo *B. bassiana*, a expressão constitutiva do gene *Bbchit1* acarreta em maior virulência a afidos *M. persicae* (FANG ET AL., 2005). Estas comparações sugerem que as quitinases produzidas por fungos exibem uma grande variabilidade funcional.

Levando em consideração o possível efeito tóxico originada pela expressão constitutiva do gene *chi3* de *M. anisopliae*, buscamos utilizar abordagens alternativas para o estudo de sua função. Como uma abordagem inicial, buscamos avaliar a sua funcionalidade tendo como base o padrão de expressão em situações fisiológicas. Esta abordagem foi delineada de acordo com elementos regulatórios encontrados na região 5' flanqueadora. Para tal, foi isolada a região 5' flanqueadora deste gene pela metodologia de *SiteFiding PCR* (TAN ET AL., 2005). A sua análise *in silico* utilizando o banco de dados Genomatix (CARTHARIUS ET AL., 2005) revelou elementos canônicos típicos de quitinases, como os de repressão catabólica MIG1 e o de ativação mediada por fontes de nitrogênio GATA (BOGO ET AL., 1998; SEIDL ET AL., 2005). Foi detectada também a presença de dois fatores até então não comuns: o fator de choque térmico em leveduras STRE e o fator para ligação da proteína StuaP em *A. nidulans*.

O fator STRE também foi encontrado em uma diversidade de genes de *T. reesei* (SEILD ET AL., 2005) e foi detectada a transcrição de genes de quitinase em condições de

estresse (térmico, osmótico e privação de nutrientes) em *Trichoderma* sp. (DANA ET AL., 2001; MACH ET AL., 1999; VITERBO ET AL., 2002). Uma das proteínas envolvidas no reconhecimento destas regiões STRE em *T. atroviride* é a *seb1*, um ortólogo da proteína Msn2/Msn4p de levedura (PETERBAUER ET AL., 2002). Mostramos que a análise de transcritos do gene *chi3* revelou um aumento de expressão após o choque térmico, sugerindo que a seqüência canônica STRE encontrada na região 5' flanqueadora do gene *chi3* é funcional.

A proteína StuaP de *A. nidulans* está envolvida no desenvolvimento da complexidade multicelular, sendo responsável indiretamente pela formação de conídeos (DUTTON ET AL., 1997). A proteína ortóloga de *A. fumigatus* está também relacionada à reprodução assexuada (SHEPPARD ET AL., 2005). A presença do elemento canônico reconhecido por esta proteína em *M. anisopliae* pode ser a melhor hipótese para a falha no isolamento de transformantes contendo cassetes para expressão constitutiva do gene *chi3*. Entretanto, a formação de conídeos na linhagem Δ chi3 não é afetada nas condições analisadas, podendo ser levantada a hipótese que a participação da quitinase CHIT30 na conidiogênese, se ela de fato ocorrer na linhagem selvagem, não seja essencial.

O estudo de quitinases em fungos filamentosos também tem sido realizado pela geração de mutantes nulos destes genes. Para analisar a possível função da quitinase CHIT30, construímos um mutante inativado por mutagênese insercional. Mostramos que a mutação ocorreu no *locus* do gene *chi3* e que estes mutantes eram incapazes de produzir transcritos do gene *chi3*. Analisando esse mutante mostramos que a germinação, a produção de esporos, a autólise e a secreção de quitinases em meio indutor no mutante Δ chi3 de *M. anisopliae* não parece ter sofrido alterações em relação à linhagem selvagem nas condições analisadas. Isto sugere que, se a quitinase CHIT30 atua em alguma destas situações fisiológicas, tem uma

participação discreta. Entretanto, ao expor micélio do mutante Δ chi3 ao choque térmico, a atividade total de quitinases diminuiu tanto na fração oriunda do meio intracelular e associada à parede celular, assim como na fração secretada. A diminuição da atividade de quitinases propiciada pela ausência da quitinase CHIT30 representa uma parcela considerável da total produzida durante o choque térmico. Entretanto o significado desta resposta ao choque térmico não está claro. Ainda, o mutante Δ chi3 apresentou menor virulência ao inseto *D. peruvianus* em relação à linhagem selvagem. A descrição de quitinases como determinantes de patogenicidade em fungos entomopatógenos foi realizada apenas para *B. bassiana* (FANG ET AL., 2005). A presença da quitinase CHIT30 durante a infecção do carrapato *B. microplus* gerou a hipótese desta enzima ser um determinante de patogenicidade (SILVA ET AL., 2005) e aqui foi confirmada. A hipótese que pode ser formulada a partir destes resultados versa sobre a atividade da quitinase CHIT30 atuando sobre a diferenciação celular durante o processo de infecção. Ainda, a sua expressão durante o choque térmico pode estar relacionado à infecção?

O fungo *M. anisopliae*, durante seu ciclo de vida, sofre constantemente alterações de temperatura, estando propenso ao estresse térmico. A maior parte do seu ciclo de vida se dá na forma de conídios quiescentes, os quais apresentam maior resistência ao choque térmico. Além do mais, a associação a solos rizosféricos incrementa a proteção contra os diversos tipos de estresse encontrados no seu habitat (HU & ST. LEGER, 2002). Outra situação em que pode ocorrer é durante o processo de infecção propriamente dito. O sistema imune do gafanhoto *L. migatoria* é caracterizado por uma termo-regulação comportamental, ou seja, ao ser infectado por *M. anisopliae*, o gafanhoto aumenta sua temperatura se aproximando de fontes de calor. Entretanto, a “febre” induzida por o inseto não é capaz por si só eliminar o fungo (OUEDRAOGO ET AL., 2003; OUEDRAOGO ET AL., 2004). A possibilidade da atividade da quitinase CHIT30 estar atuando de forma específica na reestruturação de hifas

durante a termo-regulação comportamental de hospedeiros infectados por *M. anisopliae* é uma hipótese que pode ser questionada, sendo necessário avaliar a sua localização durante este processo.

Experimentos utilizando a linhagem *chi3gfp* de *M. anisopliae* para expressão da proteína de fusão CHIT30::GFP mostraram a localização desta proteína associada à parede celular em cultivos utilizando o indutor NAG em um período específico de incubação. O peptídeo sinal predito na seqüência primária da proteína CHIT30 sugere a sua secreção, o que é de fato confirmado pela purificação desta enzima a partir de sobrenadantes de cultivo (PINTO *ET AL.*, 1997; SILVA *ET AL.*, 2005). Outra possibilidade é o ancoramento por glicosilfosfatidilinositol (GPI), via metabólica de grande importância para a morfogênese, síntese de parede celular, desenvolvimento da hifa e virulência em fungos filamentosos (BOWMAN *ET AL.*, 2006; LI *ET AL.*, 2007). Análises da seqüência primária da quitinase CHIT30 utilizando o algoritmo big-PI Predictor (EISENHABER *ET AL.*, 2000) não revelaram a presença de sítios de clivagem e modificação, próprios de proteínas ancoradas por GPI. Se ocorrer associação à parede celular, está se dá por mecanismos ainda não esclarecidos. Há também a possibilidade da secreção desta proteína. Estudos em *Aspergillus niger*, utilizando a proteína GFP como etiqueta, foram realizados para acompanhar a dinâmica do processo de secreção. O peptídeo sinal do gene que codifica para a glicoamilase foi utilizado e fusionado à GFP e a fluorescência foi concentrada na ponta da hifa, caracterizando este como local de secreção principal (GORDON *ET AL.*, 2000; KHALAJ *ET AL.*, 2001).

Apesar da fluorescência visualizada por microscopia confocal durante o desenvolvimento da linhagem *chi3gfp*, a qual expressa a proteína de fusão CHIT30::GFP, não conseguimos detectar esta proteína de fusão por *Western blot*. A possível degradação da proteína CHIT30::GFP se deva à secreção concomitante de proteases durante o cultivo em

quitina cristalina (MORAES *ET AL.*, 2003). Os estudos da localização de quitinases em fungos filamentosos por construção de etiquetas de GFP foram realizados primordialmente em *Trichoderma* spp. O intuito dos trabalhos era avaliar a expressão espaço-temporal do gene, sendo somente realizada a expressão a partir das regiões 5' flangeadoras dos genes *ech42*, *chit33* e *chit36Y* pelo acúmulo intracelular de GFP (DANA *ET AL.*, 2001; LU *ET AL.*, 2004; VITERBO *ET AL.*, 2002; ZEILINGER *ET AL.*, 1999). Em *M. anisopliae*, GFP foi utilizada como gene repórter para teste de promotores (NAKAZATO *ET AL.*, 2006), como gene repórter para a otimização de parâmetros de transformação (CAO *ET AL.*, 2007; FANG *ET AL.*, 2007) e rastreamento de uma linhagem no meio ambiente (HU & ST. LEGER, 2002). Recentemente foi utilizada para localização de uma proteína intracelular, a perilipina, envolvida na geração da pressão osmótica durante o processo de infecção (WANG & ST. LEGER, 2007a). Estes trabalhos analisaram apenas proteínas intracelulares, as quais não estão sujeitas à hidrólise mediada por proteases secretadas.

A construção de mutantes nocautes do gene *ech42* de *T. harzianum* permitiu atribuir a este gene a função de principal determinante patogenicidade deste fungo. Além do mais, é a proteína produzida por este gene é a principal enzima associada à aquisição de nutrientes (CARSOLIO *ET AL.*, 1999). Em outro estudo, um mutante nocaute de quitinase foi construído no fungo *A. nidulans* para o gene *chiA*. Mutantes nulos para este gene apresentaram menor eficiência de germinação de conídeos e menor taxa de crescimento de hifas em meio mínimo, estando diretamente envolvido no desenvolvimento. Experimentos para avaliar a atividade espaço-temporal do promotor com um gene repórter revelaram alta atividade em conídeos presentes no conidióforo, confirmando a funcionalidade deste gene no desenvolvimento (TAKAYA *ET AL.*, 1998). Posteriormente, o mesmo grupo caracterizou o gene *chiB* de *A. nidulans* como um importante componente do sistema de autólise. A quitinase produzida por este gene é responsável por grande parte da atividade enzimática

durante cultivos em privação de nutrientes, que induzem à autólise. O nocaute deste gene levou ao aumento da massa seca de micélio em cultivos relativo ao tempo de cultura em comparação à linhagem selvagem, indicando que esta enzima tem função na autólise (YAMAZAKI *ET AL.*, 2006). Os autores também retrataram seus resultados anteriores, com a geração de novos mutantes nocautes do gene *chiA*, os quais não apresentaram o fenótipo descrito anteriormente: decréscimo na taxa de germinação de esporos (YAMAZAKI *ET AL.*, 2006). O gene *chiB* de *A. fumigatus*, ortólogo do gene *chiB* de *A. nidulans*, foi também inativado e as linhagens produzidas não apresentavam fenótipo facilmente distinguível como no caso do seu ortólogo (JAQUES *ET AL.*, 2003). Estes exemplos ressaltam a dificuldade na atribuição da função a quitinases, o que é devido possivelmente à redundância em função de diversas cópias de quitinases no genoma de fungos filamentosos.

Concluindo, o gene *chi3* de *M. anisopliae* está presente em cópia única no genoma e a sua região codificante é interrompida por um único íntron. Este gene codifica para uma quitinase bifuncional que, após processada, apresenta uma massa molecular de 30 kDa. Na tentativa de elucidar sua função, mostramos que a expressão constitutiva deste gene não era viável, possivelmente devido ao efeito tóxico da expressão aumentada e constitutiva da mesma. Os mutantes nulos gerados neste trabalho não responderam de forma esperada, utilizando como possíveis fenótipos aqueles descritos na literatura. Entretanto, a análise da atividade de quitinases produzidas pelo mutante revelou diferenças em relação às aquelas produzidas pela linhagem selvagem. O significado deste achado continua incerto, mas ressalta a importância e a complexidade da participação destas enzimas na biologia de fungos.

6. CONCLUSÕES

- Genes do fungo *M. anisopliae* podem ter a sua função estudada por Agro-transformação, por genética direta e reversa.
- O gene *trp1* de *M. anisopliae* pode ser considerado um gene alvo para a otimização do processo de transformação com o intuito de melhorar a frequência de recombinação homóloga.
- A geração de uma biblioteca de mutantes de inserção em *M. anisopliae* pode ser útil na identificação de possíveis determinantes de patogenicidade.
- A resistência à radiação UV-A em conídeos com deficiência na produção de pigmentos não é diretamente relacionada ao pigmento produzido.
- O gene *chi3* de *M. anisopliae* possui em sua região 5' flanqueadora elementos canônicos de regulação que podem estar envolvidos na expressão deste gene em condições de estresse.
- A geração de transformantes nocautes para o gene *chi3* e a sua análise revelou menor virulência para o inseto modelo *D. peruvianus*.
- A secreção de quitinases no mutante nocaute do gene *chi3* apresentou redução em condições de choque térmico, comparada àquela apresentada pela linhagem selvagem.
- A construção de transformantes para a expressão de uma proteína de fusão CHIT30::GFP permitiu localizar a proteína de fusão na parede celular em experimentos de indução.
- A localização da proteína de fusão CHIT30::GFP na parede celular pode estar relacionada à possível atividade da proteína CHIT30 em aspectos de diferenciação de hifa ou pode ainda estar relacionada à secreção desta enzima.

7. PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de transformantes da biblioteca de mutantes por inserção e dar início à busca de transformantes deficientes no processo de infecção.
- Realizar experimentos de bioensaio em condições que permitam a termo regulação do hospedeiro, tentando avaliar assim a possível ligação entre a expressão em condições de estresse térmico e a virulência associada ao gene *chi3*.
- Realizar ensaios para determinar a localização da quitinase CHIT30 durante o choque térmico utilizando os transformantes que expressam a proteína de fusão CHIT30::GFP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150:2029-2035, 2004.
- AHMADIAN A, EHN M, HOBER S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363:83-94, 2006.
- ANDERSEN, S.O. Biochemistry of the insect cuticle Annual. Review of. *Entomology*, 24:29-61, 1979.
- AN G, JEONG DH, JUNG KH, LEE S. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Molecular Biology*, 59:111-123, 2005.
- ARMSTRONG GA, HEARST JE. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB Journal*, 10:228-237, 1996.
- ARRUDA V. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ARRUDA W, LUBECK I, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37:231-244, 2005.
- AZPIROZ-LEECHAN R, FELDMANN KA. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics*, 13(4):152-156, 1997.
- BAGGA S, HU G, SCREEN SE, ST. LEGER RJ. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324:159-169, 2004.
- BARATTO CM, SILVA MV, SANTI L, PASSAGLIA L, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 49:723-728, 2003.
- BARATTO CM, DUTRA V, BOLDO JT, LEIRIA LB, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*, 53:217-221, 2006.
- BATEMAN A, COIN L, DURBIN R, FINN RD, HOLLICH V, GRIFFITHS-JONES S, KHANNA A, MARSHALL M, MOXON S, SONNHAMMER EL, STUDHOLME DJ, YEATS C, EDDY SR. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32:D138-D141, 2004.
- BENDTSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340:783-795, 2004.

- BETTS MF, TUCKER SL, GALADIMA N, MENG Y, PATEL G, LI L, DONOFRIO N, FLOYD A, NOLIN S, BROWN D, MANDEL MA, MITCHELL TK, XU JR, DEAN RA, FARMAN ML, ORBACH MJ. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 44:1035-1049, 2007.
- BIDOCHKA MJ, ST. LEGER RJ, ROBERTS DW. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171:213-224, 1997.
- BOGO MR, VAINSTEIN MH, ARAGAO FJ, RECH E, SCHRANK A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 142:123-127, 1996.
- BOGO MR, ROTA CA, PINTO JR H, OCAMPOS M, CORRÊA CT, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Current Microbiology*, 37:221-225, 1998.
- BOWMAN SM, PIWOWAR A, AL DABBOUS M, VIERULA J, FREE SJ. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 5:587-600, 2006.
- BRAGA GU, RANGEL DE, FLINT SD, ANDERSON AJ, ROBERTS DW. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 82:418-422, 2006.
- BREAKSPEAR A, MOMANY M. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology*, 153:7-15, 2007.
- BRUNNER K, MONTERO M, MACH RL, PETERBAUER CK, KUBICEK CP. Expression of the *ech42* (endochitinase) gene of *Trichoderma atroviride* under carbon starvation is antagonized via a *BrlA*-like cis-acting element. *FEMS Microbiology Letters*, 218:259-264, 2003.
- BUNDOCK P, DEN DULK RAS A, BEIJERSBERGEN A, HOOYKAAS PJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 14:3206-3214, 1995.
- BUNDOCK P, VAN ATTIKUM H, DEN DULK RAS A, HOOYKAAS PJ. Insertional mutagenesis in yeast using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast*, 19, 529 – 536, 2002.
- BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT TM, JACKSON C, MAGAN N. *Fungi as biocontrol agents*, CABI Publishing, Wallingford, Oxford, USA, 2001
- CABIB E. The synthesis and degradation of chitin. *Advances in Enzymology*, 59:101, 1987.

- CAO Y, PENG G, HE Z, WANG Z, YIN Y, XIA Y. Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains. *Biotechnology Letters*, 29:907-911, 2007.
- CARSOLIO C, BENHAMOU N, HARAN S, CORTES C, GUTIERREZ A, CHET I, HERRERA-ESTRELLA A. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:929-935, 1999.
- CARTHARIUS K, FRECH K, GROTE K, KLOCKE B, HALTMEIER M, KLINGENHOFF A, FRISCH M, BAYERLEIN M, WERNER T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005 Jul 1;21(13):2933-42.
- CHOW ED, LIU OW, O'BRIEN S, MADHANI HD. Exploration of whole-genome responses of the human AIDS-associated yeast pathogen *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: nitric oxide stress and body temperature. *Current Genetics*, 52:137-148, 2007.
- COUTINHO PM, HENRISSAT B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: GILBERT HJ, DAVIES G, HENRISSAT B, SVENSSON B. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-12, 1999.
- COVE DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 113:51-56, 1966.
- COVERT SF, KAPOOR P, LEE MH, BRILEY A, NAIRN CJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* 105:259-264, 2004.
- DANA MM, LIMON MC, MEJIAS R, MACH RL, BENITEZ T, PINTOR-TORO JA, KUBICEK CP. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 38:335-342, 2001.
- DAVE A, JEENES DJ, MACKENZIE DA, ARCHER DB. HacA-independent induction of chaperone-encoding gene *bipA* in *Aspergillus niger* strains overproducing membrane proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:953-935, 2006.
- DE GROOT MJA, BUNDOCK P, HOOYKAAS PJJ, BEIJERSBERGEN AGM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16:839-842, 1998.
- DRIVER F, MILNER RJ, TRUEMAN JWH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104:134-150, 2000.
- DONG C, ZHANG J, HUANG H, CHEN W, HU Y. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *Dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiological Research*, in press, 2007.
- DUO-CHUAN L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161:345-360, 2006.

- DUTTON JR, JOHNS S, MILLER BL. StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal* 16:5710-5721, 1997.
- DUTRA V, NAKAZATO L, BROETTO L, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology*, 155:245–251, 2004.
- EIGENHEER RA, JIN LEE Y, BLUMWALD E, PHINNEY BS, GELLI A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*, 7:499-510, 2007.
- EISENHABER B, BORK P, YUAN Y, LOFFLER G, EISENHABER F. Automated annotation of GPI anchor sites:case study *C. elegans*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:340-341, 2000.
- ESPESO EA, TILBURN J, SANCHEZ-PULIDO L, BROWN CV, VALENCIA A, ARST HN JR, PENALVA MA. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *Journal of Molecular Biology*, 274:466-480, 1997.
- FAN Y, FANG W, GUO S, PEI X, ZHANG Y, XIAO Y, LI D, JIN K, BIDOCHKA MJ, PEI Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:295-302, 2007.
- FANG W, LENG B, XIAO Y, JIN K, MA J, FAN Y, FENG J, YANG X, ZHANG Y, PEI Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:363-370, 2005.
- FANG W, PEI Y, BIDOCHKA MJ. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153:1017-1025, 2007.
- FERNÁNDEZ-ABALOS JM, FOX H, PITT C, WELLS B, DOONAN JH. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 27:121-130, 1998.
- FERREIRA MES, HEINEKAMP T, HARTL A, BRAKHAGE AA, SEMIGHINI CP, HARRIS SD, SAVOLDI M, DE GOUVEA PF, DE SOUZA GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genetics and Biology*, 44:219-30, 2007.
- FITZGERALD A, VAN KAN JA, PLUMMER KM. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology*, 41:963-971, 2004.
- FRANSCSCHINI, M. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

- FRAZZON APG, VAZ JUNIOR IS, MASUDA A, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94:117–125, 2000.
- FREIMOSER FM, SCREEN S, BAGGA S, HU G, ST. LEGER RJ. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 149:239–247, 2003.
- GARDINER DM, HOWLETT BJ. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics*, 45:249-255, 2004.
- GOMEZ BL, NOSANCHUK JD. Melanin and fungi. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16:91-96, 2003.
- GORDON CL, ARCHER DB, JEENES DJ, DOONAN JH, WELLS B, TRINCI AP, ROBSON GD. A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods*, 42:39-48, 2000.
- HENRISSAT B. Classification of chitinases modules. In, JOLLÈS P, MUZZARELI RAA. *Chitin and chitinases*, Basel, Switzerland, 39 Burkhäuser:137–156, 1999.
- HOLLIS T, MONZINGO AF, BORTONE K, ERNST S, COX R, ROBERTUS JD. The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Science*, 9:544-551, 2000.
- HOLSTERS M, DE WAELE D, DEPICKER A, MESSENS E, VAN MONTAGU M, SCHELL J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*, 163:181–187, 1978.
- HORNBOSTEL VL, ZHIOUA E, BENJAMIN MA, GINSBERG HS, OSTFELDT RS. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae) nymphs. *Experimental and Applied Acarology*, 35:301-316, 2005.
- HOWARD MB, EKBORG NA, TAYLOR LE 2ND, WEINER RM, HUTCHESON SW. Chitinase B of "*Microbulbifer degradans*" 2-40 contains two catalytic domains with different chitinolytic activities. *Journal of Bacteriology*, 186:1297-1303, 2004
- HU G, ST. LEGER RJ. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6383 – 6387, 2002.
- HURTADO-GUERRERO R, VAN AALTEN DM. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* chitinase 1 and screening-based discovery of potent inhibitors. *Chemical Biology*, 14:589-599, 2007.
- IKE M, NAGAMATSU K, SHIOYA A, NOGAWA M, OGASAWARA W, OKADA H, MORIKAWA Y. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:294-303, 2006.

- JAIQUES AK, FUKAMIZO T, HALL D, BARTON RC, ESCOTT GM, PARKINSON T, HITCHCOCK CA, ADAMS DJ. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology*, 149:2931-2939, 2003.
- JARROLD SL, MOORE D, POTTER U, CHARNLEY AK. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*, 111:240-249, 2007.
- JEON J, PARK SY, CHI MH, CHOI J, PARK J, RHO HS, KIM S, GOH J, YOO S, CHOI J, PARK JY, YI M, YANG S, KWON MJ, HAN SS, KIM BR, KHANG CH, PARK B, LIM SE, JUNG K, KONG S, KARUNAKARAN M, OH HS, KIM H, KIM S, PARK J, KANG S, CHOI WB, KANG S, LEE YH. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics*, 39:561-565, 2007.
- JUAREZ MP, CRESPO R, FERNANDEZ GC, LECUONA R, CAFFERATA LF. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76:198-207, 2000.
- KAAYA GP, MUNYINYI DM. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 237 – 241, 1995.
- KERSHAW MJ, MOORHOUSE ER, BATEMAN R, REYNOLDS SE, CHARNLEY AK. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 213-223, 1999.
- KHALAJ V, BROOKMAN JL, ROBSON GD. A study of the protein secretory pathway of *Aspergillus niger* using a glucoamylase-GFP fusion protein. *Fungal Genetics and Biology*, 32:55-65, 2002.
- KHANG CH, PARK SY, LEE YH, KANG S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:483-492, 2005.
- KLEMSDAL SS, CLARKE JL, HOELL IA, EIJSINK VG, BRURBERG MB. Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (ech30) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS Microbiology Letters*, 256:282-289, 2006.
- KUNG LA, SNYDER M. Proteome chips for whole-organism assays. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 7:617-622, 2006.
- LANGFELDER K, STREIBEL M, JAHN B, HAASE G, BRAKHAGE AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38:143-158, 2003.
- LI H, ZHOU H, LUO Y, OUYANG H, HU H, JIN C. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Molecular Microbiology*, 64:1014-1027, 2007.

- LIMON MC, LORA JM, GARCIA I, DE LA CRUZ J, LLOBELL A, BENITEZ T, PINTOR-TORO JA. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 28:478-483, 1995.
- LIMON MC, PINTOR-TORO JA & BENITEZ T. Increased antifungal activity of *T. harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Biological. Control* 89:254–261, 1999.
- LIOLIOS K, TAVERNARAKIS N, HUGENHOLTZ P, KYRPIDES, NC. The Genomes On Line Database (GOLD) v.2:a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Research*, 34:D332-D334, 2006.
- LIU ZY, LIANG ZQ, WHALLEY AJ, YAO YJ, LIU AY. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 178 – 182, 2001.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-408, 2001.
- LOFTUS BJ, FUNG E, RONCAGLIA P ET AL. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307:1321-1324, 2005.
- LORD JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond:the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89:19-29, 2005.
- LORD JC, HOWARD RW. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera:Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*. 158:211-217, 2004.
- LU Z, TOMBOLINI R, WOO S, ZEILINGER S, LORITO M, JANSSON JK. In vivo study of trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3073-3081, 2004.
- MACH RL, PETERBAUER CK, PAYER K, JAKSITS S, WOO SL, ZEILINGER S, KULLNIG CM, LORITO M, KUBICEK CP. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1858–1863, 1999.
- MARANGA RO, KAAAYA GP, MUEKE JM, HASSANALI A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia*, 159:527-532, 2005.
- MARION CL, RAPPLEYE CA, ENGLE JT, GOLDMAN WE. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Microbiology*, 62:970-983, 2006.
- MARTINEZ-PASTOR MT, MARCHLER G, SCHULLER C, MARCHLER-BAUER A, RUIS H, ESTRUCH F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and

- Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO Journal*, 15:2227-2235, 1996.
- MICHIELSE CB, HOOYKAAS PJ, VAN DEN HONDEL CA, RAM AF. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48:1-17, 2005a
- MICHIELSE CB, ARENTSHORST M, RAM AF, VAN DEN HONDEL CA. Agrobacterium-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:9-19, 2005b.
- MORAES CK, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 46:205-210, 2003.
- NAKAZATO L, DUTRA V, BROETTO L, STAATS CC, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72:521-528, 2006.
- NEEDHAM PG, TRUMBLY RJ. In vitro characterization of the Mig1 repressor from *Saccharomyces cerevisiae* reveals evidence for monomeric and higher molecular weight forms. *Yeast*. 23:1151-1166, 2006.
- NEMECEK JC, WUTHRICH M, KLEIN BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, 312:583-588, 2006.
- OUEDRAOGO RM, CUSSON M, GOETTEL MS, BRODEUR J. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82:103-109, 2003.
- OUEDRAOGO RM, GOETTEL MS, BRODEUR J. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. *Oecologia*, 138:312-319, 2004
- PAL S, ST LEGER RJ, WU LP. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282:8969-8977, 2007.
- PALMA LP. Análise do padrão de expressão dos genes *Chit1*, *chit2* e *chit3* que codificam quitinases no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- PEL HJ, DE WINDE JH, ARCHER DB ET AL. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25:221-331, 2007.
- PEDRINI N, CRESPO R, JUAREZ MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, 146:124-137, 2007.

- PETERS DG, CADDICK MX. Direct analysis of native and chimeric GATA specific DNA binding proteins from *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research*, 22:5164-5172, 1994.
- PINTO AS, BARRETO CC, SCHRANK A, ULHOA CJ, VAINSTEIN MH. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:322-327, 1997.
- QAZI SS, KHACHATOURIANS GG. Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95:48-59, 2007.
- RAM AF, KLIS FM. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols*, 1:2253-2256, 2006.
- RANGEL DE, BUTLER MJ, TORABINEJAD J, ANDERSON AJ, BRAGA GU, DAY AW, ROBERTS DW. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93:170-182, 2006.
- RAO FV, HOUSTON DR, BOOT RG, AERTS JM, HODKINSON M, ADAMS DJ, SHIOMI K, OMURA S, VAN AALTEN DM. Specificity and affinity of natural product cyclopentapeptide inhibitors against *A. fumigatus*, human, and bacterial chitinases. *Chemical Biology*, 12:65-76, 2005.
- ROBERTS DW, ST LEGER RJ. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54:1-70, 2004.
- SAMBROOK J, RUSSEL DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- SCHOLTE EJ, KNOLS BG, TAKKEN W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91:43-49, 2006
- SCHOLTE EJ, TAKKEN W, KNOLS BG. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 102:151-158, 2007.
- SCREEN SE, HU H, ST. LEGER RJ. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78:260-266, 2001.
- SEIDL V, HUEMER B, SEIBOTH B, KUBICEK CP. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal*, 272:5923-5939, 2005.
- SILVA MV, SANTI L, STAATS CC, COSTA AM, COLODEL EM, DRIEMEIER D, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology*, 156:382-392, 2005.

- SMALL CL, BIDOCHKA MJ. Up-regulation of Prl, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 109:307-313, 2005.
- SOSA-GOMEZ DR, BOUCIAS DG, NATION JL. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69:31-39, 1997.
- ST. LEGER RJ, COOPER RM, CHANRLEY AK. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*, 133:1371-1382, 1987.
- ST. LEGER RJ, BUTT TM, GOETTEL MS, STAPLES RC, ROBERTS DW. Production in vitro of apressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13:274-288, 1989.
- ST. LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58:415-426, 1991.
- ST LEGER RJ, STAPLES RC, ROBERTS DW. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120:119-124, 1992.
- ST LEGER RJ, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, RIZZO NW, ROBERTS DW. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1257-1264, 1996a.
- ST. LEGER RJ, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, RIZZO NW, ROBERTS DW. Characterization and ultrastructural localization of chitinase from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:907-912, 1996b
- ST. LEGER RJ, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:6349-6354, 1996c.
- ST. LEGER RJ, JOSHI L, ROBERTS DW. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:709-713, 1998.
- STAATS CC, JUNGES A, FITARELLI M, FURLANETO MC, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:945-950, 2007.
- TAIB M, PINNEY JW, WESTHEAD DR, MCDOWALL KJ, ADAMS DJ. Differential expression and extent of fungal/plant and fungal/bacterial chitinases of *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Microbiology*, 184:78-81, 2005.

- TAKAYA N, YAMAZAKI D, HORIUCHI H, OHTA A, TAKAGI M. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62:60-65, 1998.
- TAN G, GAO Y, SHI M, ZHANG X, HE S, CHEN Z, AN C. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research*, 33:e122, 2005.
- TANAKA S, KONDO N, NAITO S. Isolation of pathogenicity- and gregatin-deficient mutants of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* through *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. *Journal of General Plant Pathology*, 73:242-249, 2007.
- TANGUAY P, BOZZA S, BREUIL C. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. *Fungal Genetics and Biology*, 43:804-812, 2006.
- THOMAS MB, READ AF. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews in Microbiology*, 5:377-383, 2007.
- TIROSH I, BERMAN J, BARKAI N. The pattern and evolution of yeast promoter bendability. *Trends in Genetics*, 23:318-321, 2007.
- TOLEDO AV, DE REMES LENICOV AM, LOPEZ LASTRA CC. Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota:Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera:Delphacidae), and *Dalbulus maidis* (Hemiptera:Cicadellidae), vectors of corn diseases. *Mycopathologia*, 163:225-232, 2007.
- VITERBO A, HARAN S, FRIESEM D., RAMOT O, CHET I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*, 200:169-174, 2001.
- VITERBO A, MONTERO M, RAMOT O, FRIESEM D, MONTE E, LLOBELL A, CHET I. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (T. *harzianum* T-203). *Current Genetics*, 42:114-122, 2002.
- WANG C, TYPAS MA, BUTT TM. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 213:251-255, 2002.
- WANG C, ST LEGER RJ. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell*, 4:937-947, 2005.
- WANG C, HU G, ST LEGER RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudates and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42:704-718, 2005.
- WANG C, ST LEGER RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103:6647-6652, 2006.

- WANG C, ST LEGER RJ. The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 282:21110-21115, 2007a.
- WANG C, ST LEGER RJ. 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*, 6:808-816, 2007b.
- WALTON FJ, IDNURM A, HEITMAN J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 57:1381-1396, 2005.
- WELD RJ, PLUMMER KM, CARPENTER MA, RIDGWAY HJ. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16:31-44, 2006.
- WHITE D, CHEN, W. Towards identifying pathogenic determinants of the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *European Journal of Plant Pathology*, in press, 2007.
- XANDER P, VIGNA AF, FEITOSA LD, PUGLIESE L, BAILAO AM, SOARES CM, MORTARA RA, MARIANO M, LOPES JD. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes and Infection*, in press, 2007.
- XIA G, JIN C, ZHOU J, YANG S, ZHANG S, JIN C. A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *European Journal of Biochemistry*, 268:4079-4085, 2001;
- XU JR, PENG YL, DICKMAN MB, SHARON A. The dawn of fungal pathogen genomics. *Annual Review of Phytopathology*. 44:337-366, 2006.
- YAMAZAKI H, YAMAZAKI D, TAKAYA N, TAKAGI M, OHTA A, HORIUCHI H. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 51:89-98, 2006.
- YU JH, HAMARI Z, HAN KH, SEO JA, REYES-DOMINGUEZ Y, SCAZZOCCHIO C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41:973-981, 2004.
- ZEILINGER S, GALHAUP C, PAYER K, WOO SL, MACH RL, FEKETE C, LORITO M, KUBICEK CP. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology*, 26:131-140, 1999.
- ZHAO H, CHARNLEY AK, WANG Z, YIN Y, LI Z, LI Y, CAO Y, PENG G, XIA Y. Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biochemistry*, 140:319-327, 2006.
- ZWIERS L, WAARD MA. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 39, 388 – 393, 2001.

9. ANEXO I

Artigo “Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene” da autoria de da Silva MV, Santi L, **Staats CC**, da Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein MH, Schrank A, publicado no Periódico *Research in Microbiology*, N. 156, PP. 382 – 392 no ano de 2005.

Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene

Márcia Vanusa da Silva^a, Lucélia Santi^a, Charley Christian Staats^a, Andrea Miura da Costa^a,
Edson Moleta Colodel^b, David Driemeier^b, Marilene Henning Vainstein^{a,c},
Augusto Schrank^{a,d,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, P.O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 2 September 2004; accepted 25 October 2004

Available online 8 December 2004

Abstract

The characterization of chitinase genes and enzymes is an important step toward global understanding of the chitinolytic system in entomopathogenic fungi. Chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (strain E6) has both endo- and exochitinase activities and is a potential determinant of pathogenicity. Serum anti-CHIT30 specifically detected this chitinase amongst five isoenzymes shown in glycol-chitin activity gels. Chitinase CHIT30 secretion is upregulated by chitin, tick cuticle and low concentrations of *N*-acetylglucosamine (0.25%) and is downregulated by both high *N*-acetylglucosamine (1%) and glucose (1%) concentrations. Chitinase CHIT30 was produced at tick cuticle during fungal infection. The *chi3* gene was assigned to code chitinase CHIT30 in *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; Chitinases; Biological control

1. Introduction

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin is a well-characterized, broad host-range arthropod pathogen [12,16,46,54] employed in biological control of agricultural pests [44]. Moreover, *M. anisopliae*'s ability to infect the ticks *Boophilus microplus*, *Ixodes scapularum* and *Rhipicephalus sanguineus* has also been reported [4,10,16,25,35], expanding its biocontrol potential application to the animal production chain.

Entomopathogenic fungi actively invade their hosts through the cuticle by mechanical pressure, via a pressorium formation, and enzymatic degradation by synergistic

action of hydrolases [8,9,36,47]. Chitin microfibrils constitute around 30% of the arthropod cuticle and therefore represent a barrier to invasion. Consequently, chitinases are among the enzymes considered critical for host invasion [18, 19,29,43,47,49].

Chitinases have many roles in an increasingly wide range of biological systems [21]. In filamentous fungi, chitinases have at least two physiological roles, hyphal growth/morphogenesis and nutrient acquisition [22,42]. Although all *M. anisopliae* strains analyzed to date are prolific producers of chitinases, the role of these enzymes during host infection is still not fully understood [43,50]. Demonstration of chitinase production in situ, during host cuticle penetration, has only once been documented [47].

Genes encoding chitinases were cloned from a wide range of fungi and all their products are classified in glycohydrolase family 18, which can be grouped into two classes

* Corresponding author.

E-mail address: aschrank@cbiot.ufrgs.br (A. Schrank).

according to sequence similarity: plant-like and bacterial-like chitinases [23]. At least six different chitinases (30, 33, 43.5, 45, 60 and 110 kDa) have already been characterized in *M. anisopliae* [27,36,47,50], but only three different genes were isolated (*chit1* [6]; *chi2* and *chi3* [17]). The *chit1* gene was further characterized. It has a 1521-bp ORF that encodes a 423 amino acids pre-pro-protein, with a stretch of 35 amino acid residues displaying characteristics of signal peptide. The deduced mature protein has a predicted molecular mass of 42 kDa [6] that is in close agreement with the 45 kDa determined for the *M. anisopliae* chitinase identified earlier [47]. The comparison of the *chit1* gene deduced amino acid sequence has high identity with at least two other chitinases with different biological roles: (i) *Serratia marcescens chitA* gene product, that renders metabolically accessible small molecules from chitin and restricts filamentous fungi growth in its soil microhabitat [21]; and (ii) *Aspergillus nidulans chiA* gene product, suggested to be involved in cell wall dynamics [52]. *M. anisopliae chit1* gene overexpression could not be assigned to either morphological cell wall alterations or host virulence [43].

Previously, we characterized a 30 kDa chitinase (CHIT30) with both endo- and exochitinase activities. Therefore, CHIT30 is capable of degrading chitin to completion and is a putative candidate for participating in host-cuticle degradation during penetration [36]. The characterization of the whole chitinolytic system of *M. anisopliae* at the gene level is important in ascertaining the function of each enzyme in growth/morphogenesis and in pathogenicity. Here we report that antiserum specific to chitinase CHIT30 detects high production of this protein during the tick *B. microplus* cuticle penetration by *M. anisopliae*. cDNA library immunoscreening led to the isolation of sequences homologous to the previously reported ortholog *M. anisopliae* var. *acridum chi3* gene (**CACO7217.1**).

2. Materials and methods

2.1. Organism and culture conditions

M. anisopliae E₆, from the Microbial Genetics Group Collection (Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, USP, Brazil) was maintained and conidia were produced as described [36]. To induce chitinase production, conidia (10^6 ml⁻¹) were inoculated into 2-l flasks containing 500 ml of minimal medium (MM, NaNO₃ 6 g l⁻¹/chitin 8 g l⁻¹) plus salts and trace element solutions according to Pinto et al. [36]. The flasks were incubated at 28 °C on a rotatory-shaking platform (180 rpm). After 120-h incubation, mycelia were harvested by filtration through a Whatman No. 1 filter paper and the culture filtrate used for enzyme purification. Sodium azide was added to a final concentration of 0.01% (w/v).

2.2. Analytical procedures

Chitinolytic activity was determined using *N,N'*-diacetylchitobiose (4 mM) to detect *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase and *N,N',N'',N'''*-tetraacetylchitotetraose (4 mM) to detect endochitinase activities. The reaction mixture was: 40 μl 0.2 mM acetate buffer (pH 5.4)/10 μl of substrate/120 μl sample. After 1-h incubation at 37 °C the amount of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) released was determined by the method described by Reissig et al. [40]. One unit of chitinase was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol min⁻¹ GlcNAc at 37 °C. The protein content was determined by the method of Bradford [7] using known concentrations of bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.3. Chitinase purification, preparation of antiserum and immunoblotting

All purification procedures were carried out at 4 °C and according to Pinto et al. [36] with minor modifications. To the cell-free *M. anisopliae* culture broth (20 l) ammonium sulfate was added to achieve 85% saturation. The precipitate was collected by centrifugation at 10 000 *g* for 30 min, dissolved in 20 mM acetate buffer (pH 5.5), and dialyzed against the same buffer for 24 h at 4 °C. The dialyzed culture filtrate (300 ml) was loaded onto a DEAE-Sepharose column (2 × 30 cm) equilibrated with 50 mM acetate buffer (pH 5.5). The unbound proteins were washed from the column with 500 ml of equilibration buffer. The remaining protein was eluted by a continuous linear gradient of 500 ml of the same buffer containing 0–1 M NaCl, at a flow rate of 120 ml h⁻¹. Fractions with chitinase activity were pooled, dialyzed against 50 mM acetate buffer (pH 5.5) and applied onto a Q-Sepharose column (1 × 10 cm) equilibrated with the same buffer at a flow rate of 60 ml h⁻¹. During the purification steps, protein was spectrophotometrically determined at 280 nm and assayed for chitinase activity.

Antiserum against purified CHIT30 was raised in a two month-old New Zealand white rabbit. Purified CHIT30 (30 μg), emulsified with Freund's complete adjuvant, was injected subcutaneously, at 14-day intervals (total of 5 injections). Serum collected after the third injection was titrated by western blot. Serum was collected prior to immunization and used as control.

For western blot analysis, proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes. The blotted membranes were blocked with 5% (w/v) nonfat dried milk in Tris-buffered saline (TBS-T, 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) for 120 min at room temperature. After blocking, the membranes were incubated overnight at 4 °C in TBS-T containing the anti-CHIT30 serum diluted 1:3000. The membranes were incubated with anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated at a 1:6000 dilution, washed and revealed according to the manufacturers instructions (Sigma).

2.4. Electrophoretic procedures

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (12%, SDS–PAGE) was carried out according to Laemmli [32]. For the detection of chitinase activity, electrophoresis was performed in 10% SDS–PAGE containing 0.01% (w/v) glycol chitin, prepared according to Molano et al. [34]. Gel loading buffer was the same as described by Laemmli [32], but β -mercaptoethanol was omitted. Following electrophoresis, chitinase activity was detected by a modification of the Trudel and Asselin [51] method. Gels were gently shaken for 20 h at 30 °C in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 1% Triton X-100 (v/v). Gels were stained with 100 ml of freshly prepared solution of 0.01% (w/v) calcofluor white M2R in 500 mM Tris–HCl (pH 8.9). After 10 min, the brightener solution was removed and the gels were shaken for 1 h in frequent changes of distilled water. Lytic zones representing digested chitin were visualized under UV light and recorded.

For isoelectric focusing (IEF) proteins were solubilized in 250 μ l of 9.2 M urea, 2% Triton X-100 (v/v), 0.005% bromophenol blue (w/v), 1% IPG buffer solution (v/v). The solubilized proteins were loaded onto a 13 cm immobilized linear pH gradient (IPG) strip, pH 3–10 (Amersham Biosciences). IEF was performed in the IPGphor system (Amersham Biosciences) at 60 000 V h⁻¹ at 20 °C. After IEF, the strips were equilibrated for 30 min in 6 M urea, 50 mM Tris–HCl, 1% SDS (w/v), 2% β -mercaptoethanol (v/v), 0.05% bromophenol blue (w/v), 30% glycerol (v/v), pH 6.8, buffer and analyzed by SDS–PAGE (12%). Gels were stained with silver nitrate [5].

2.5. cDNA library immunoscreening and sequence analysis

The anti-CHIT30 serum was used to isolate cDNA clones from a library constructed from poly(A⁺) RNA, extracted from *M. anisopliae* strain E6 grown on *B. microplus* cuticle supplemented medium, cloned into λ ZipLox vector (GIBCO-BRL). Around 200,000 plaque-forming units (PFU) were used to infect *Escherichia coli* Y1090ZL and the screening was performed according to standard procedures [41]. Positive clones were converted into plasmids and analyzed for the presence of inserts. Inserts were sequenced at the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using an automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer and analyzed by Blast using the NCBI server at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

The amino acid sequence of several fungi and three representative bacterial chitinases (accession numbers in Fig. 5) were aligned using ClustalX [53] and then analyzed with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software [30] by the neighbor-joining method. Phylogenetic tree architecture confidence was evaluated by 1000 bootstrap replications.

Table 1
Substrate specificity of the purified CHIT30 from *M. anisopliae* var. *anisopliae*

Substrate	Chitinase activity (U)
Swollen chitin	4.10 \pm 0.05
<i>N,N',N'',N'''</i> -Tetraacetylchitotetraose	9.93 \pm 0.09
<i>N,N'</i> -Diacetylchitobiose	7.13 \pm 0.12

One unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the release of 1 GlcNAc μ mol min⁻¹ at 37 °C. The results are the means of three replicates \pm SD.

2.6. Light microscopy and immunocytochemistry

Ingurgitated females of *B. microplus* ticks were infected with *M. anisopliae* strain E6 conidia suspensions [16] and processed for optical microscopy. Ticks were fixed overnight at 4 °C with 2% glutaraldehyde (v/v), 2% paraformaldehyde (v/v) solution in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in 50–95% ethanol and embedded in Leica historesin [37]. Immunocytochemistry processing was carried out by blocking histological sections with 0.5% casein (w/v) in phosphate buffered saline (PBS) for one minute, washing with PBS and reacting to either anti-CHIT30 serum (1:1000) or pre-immune serum for 16 h at 4 °C. Sections after washing with PBS were stained with avidin–biotin and developed with a 3,3'-diaminobenzidine (LSAB[®] system HRP, DAKO). Contrast staining was done with 0.4% hematoxylin (w/v) and slides were analyzed under the microscope (Eclipse E600, NIKON) at 400 \times . Staining with periodic acid-Schiff (PAS)-green light was conducted to evaluate fungal growth during infection.

3. Results

3.1. CHIT30 purification and western blot analysis

M. anisopliae culture supernatant proteins were concentrated by ammonium sulfate precipitation and the chitinase CHIT30 was purified by a two-step procedure using anionic exchange liquid chromatography, in DEAE-Sepharose and Q-Sepharose ([36], with modifications). The apparent molecular mass of purified CHIT30 was determined to be approximately 30 kDa by both SDS–PAGE as previously reported [36] and 2D SDS–PAGE (this work). The purified CHIT30 is capable of both endo- and exochitinase activities based on the degradation of chitin oligomers (Table 1) and glycolchitin.

SDS–PAGE and 2D-gels (Fig. 1A and 1B) show a single protein band with an apparent molecular mass of 30 kDa (pI 5.4), suggesting that the protein was highly purified (Fig. 1A). The specificity of the antiserum raised against purified *M. anisopliae* CHIT30 was verified by western blot. The antiserum recognized a protein with apparent molecular mass of 30 kDa in *M. anisopliae* culture supernatants. It is noteworthy that other chitinases secreted by *M. anisopliae*

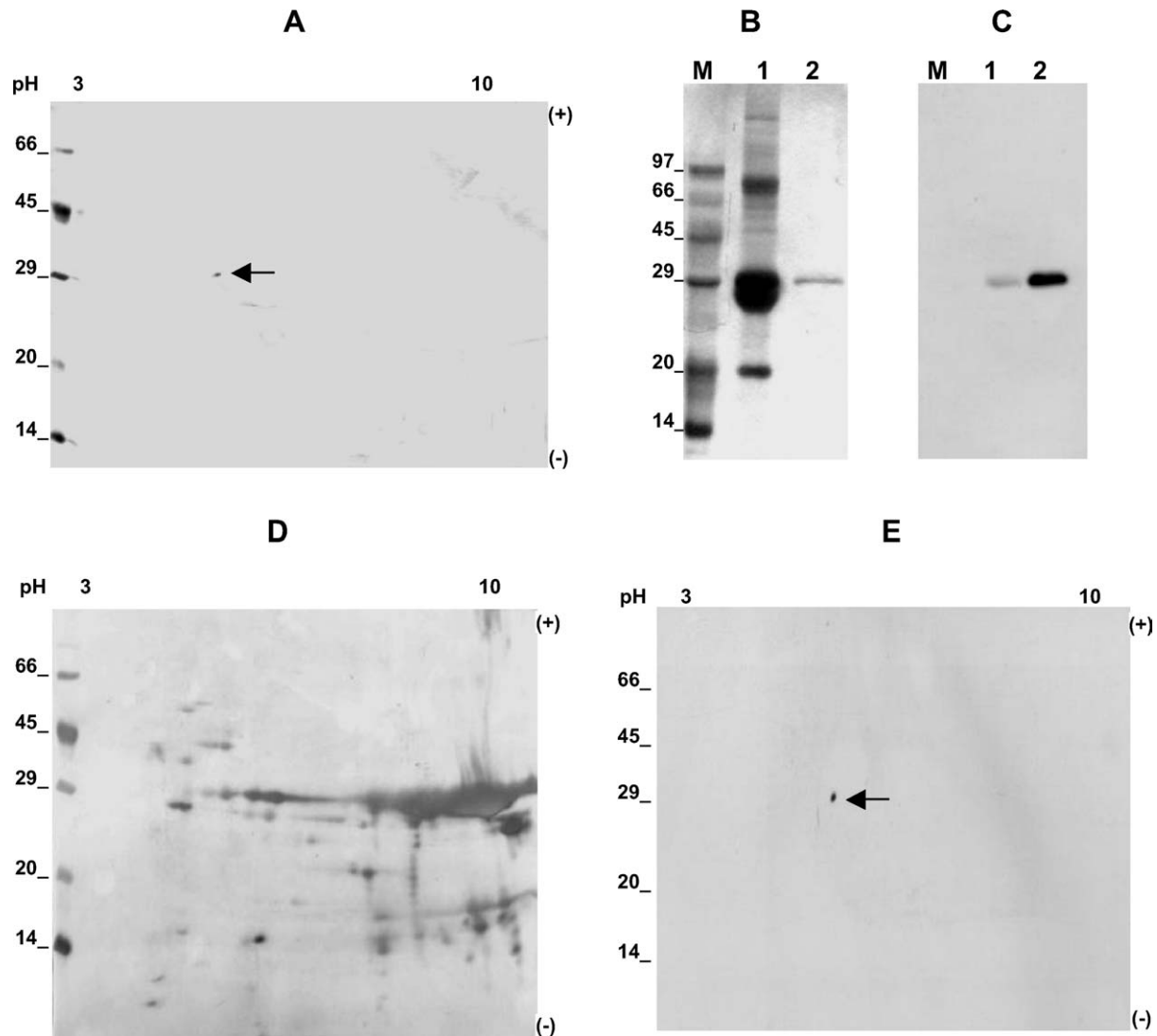


Fig. 1. CHIT30 chitinase purification from *M. anisopliae* and antisera specificity. Panel (a) Silver-stained 2D-PAGE of purified CHIT30 chitinase (30 µg); (b) SDS-PAGE (12%); and (c) western blot: (lane 1) concentrated *M. anisopliae* chitin added culture, and (lane 2) purified CHIT30 chitinase; (d) silver-stained 2D-PAGE of *M. anisopliae* chitin-added culture (300 µg) and (e) western blot. Numbers at the left of each panel represent molecular weight markers (MW) in kDa. In the 2D gels pH represents the range of IEF using 13 cm IPG strips (pH 3–10). (+) and (–) represent the migration direction. The westerns were performed with anti-CHIT30 serum using the ECL system (Amersham Biosciences).

did not share major antigenic determinants with CHIT30 (Fig. 1C, 1D, and 1E). Electrophoretic analysis of chitinase activity showed that at least five distinct glycol-chitin degradation bands were detected in chitin-induced *M. anisopliae* E6 culture filtrates (Fig. 2). The glycol-chitin incorporated in activity gels is a chemically modified derivative of chitin and is a soluble substrate for the study of several endochitinases, since it detects them more readily than *N*-acetylglucosaminidase or exochitinases [51]. The anti-CHIT30 serum recognized only the highest electrophoretic mobility protein band, which has the same motility as the purified CHIT30 chitinase (Fig. 2). The high percentage of ammonium sulfate (85%) used to concentrate culture filtrate proteins was not sufficient to precipitate all chitinases present in the culture supernatant, since only two bands of degradation were visualized (Fig. 2A, lane 2).

3.2. Chitinase CHIT30 regulation

Chitinase gene expression in microorganisms has been reported to be controlled by a repressor/inducer system in which both chitin and the monomer GlcNAc act as inducers [14]. High levels of chitinase were found in *M. anisopliae* cultures supplied with chitin but not with pectin, xylan or cellulose [45]. Previously, we reported the effect of different carbon sources on both total chitinase synthesis and secretion in *M. anisopliae* and dual regulation depending on the GlcNAc concentration in the culture medium [3,6,29,36]. In an attempt to determine the regulation of CHIT30 at the protein secretion level, culture supernatants of *M. anisopliae* grown in minimal medium amended with different substrates such as chitin 1%, tick cuticle 1%, GlcNAc 0.25% and glucose 1%, were analyzed by western blot using anti-CHIT30

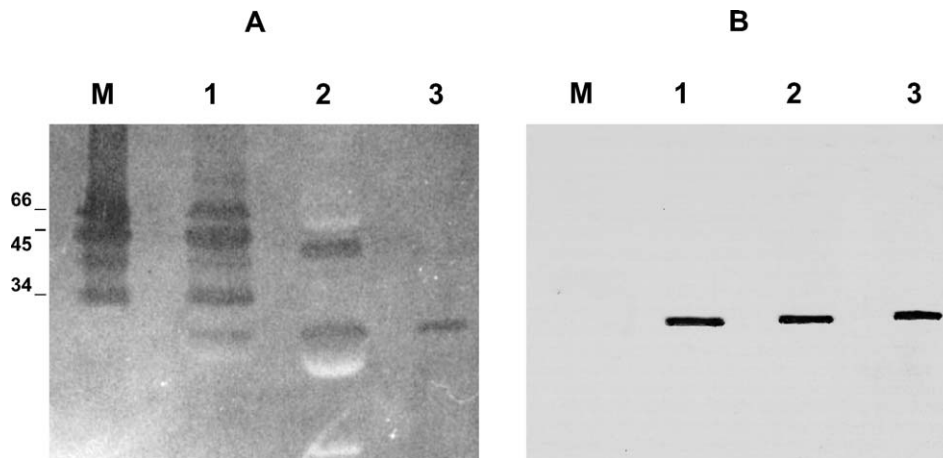


Fig. 2. Identification of CHIT30 chitinase among the extracellular chitinases from *M. anisopliae*. (a) Chitinase activity after SDS-PAGE (10%) in gel containing 0.01% (w/v) glycol chitin substrate. (b) Western blot with anti-CHIT30 serum. (M) *Streptomyces griseus* chitinase markers. Lane 1: filtrates from chitin-grown cultures; lane 2: concentrated ammonium sulfate 85% saturation; and lane 3: purified chitinase CHIT30.

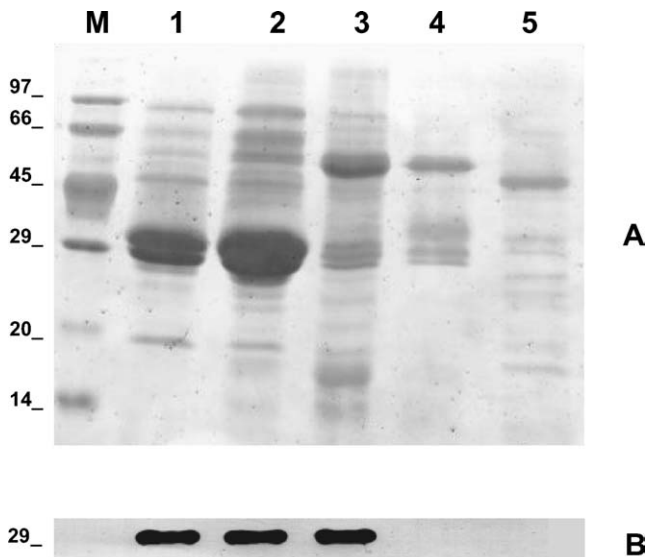


Fig. 3. *M. anisopliae* CHIT30 chitinase regulation in culture medium. (a) SDS-PAGE 12% of secreted proteins; (b) western assayed with anti-CHIT30 serum. Lane M: MW; lane 1: culture medium with addition of chitin 1%; lane 2: culture medium with addition of tick (*B. microplus*) cuticle 1%; lane 3: culture medium added of GlcNAc 0.25%; lane 4: culture medium added of GlcNAc 1%; lane 5: culture medium with addition of glucose 1%. Seventy μ g of total extracellular protein were loaded at each lane of the gel. SDS-PAGE was revealed with silver stain. The western blot was carried out using an ECL kit (Amersham Biosciences). Serum anti-CHIT30 dilution was 1:3000.

serum. This analysis, shown in Fig. 3, reveals that CHIT30 was induced by chitin 1%, cuticle 1% and GlcNAc 0.25%, and was repressed by GlcNAc 1% and glucose 1%. GlcNAc shows dual regulation of chitinase production. At low concentrations (0.25%), it induced the production of the enzyme but repressed chitinase secretion at higher concentrations (over 1.0%).

3.3. *In situ* immunodetection of chitinase CHIT30 during *B. microplus* infection

To gain information on the actual production of the chitinase CHIT30 during *M. anisopliae* host infection, immune histological experiments were carried out using as a model-host the tick *B. microplus*. Ingurgitated female ticks were infected with *M. anisopliae* strain E6 conidia and examined at 48 and 72 h after infection through histological sections probed with anti-CHIT30 serum. The actual infection was followed by histological sections stained with periodic acid-Schiff (PAS)-green light. As shown in Fig. 4A, the cuticle of non-infected ticks is detected by the green color of the green light counterstain. Although PAS staining has high affinity for polysaccharides (indicated by the purple color), the chitin microfibril in the cuticle is tightly organized and is embedded in proteins, precluding staining. However, during fungal penetration, accomplished by cuticle hydrolysis, the altered chitin becomes available for staining by PAS, rendering zones of purple color (Fig. 4F). The analysis of the *M. anisopliae* colonized *B. microplus* provided an overview of the infection. The fungus, intensively stained by PAS, breached the upper layer of the cuticle and developed towards the hemocoel (Fig. 4C and 4F).

CHIT30 immunolabeling of *B. microplus* cuticles 48 h after infection varied from slight to moderate and was concentrated at the upper layer of the cuticle (Fig. 4E). Overall CHIT30 labeling increased at 72 h after infection (Fig. 4H) and immunolabeling was concentrated at the upper layer of the cuticle and was diffuse at the inner region. Control histological sections showed no immunolabeling (Fig. 4B, 4D and 4G).

3.4. cDNA library immunoscreening and sequence analysis

In order to clone the chitinase CHIT30 coding sequence, around 200 000 λ phage clones were screened with the anti-

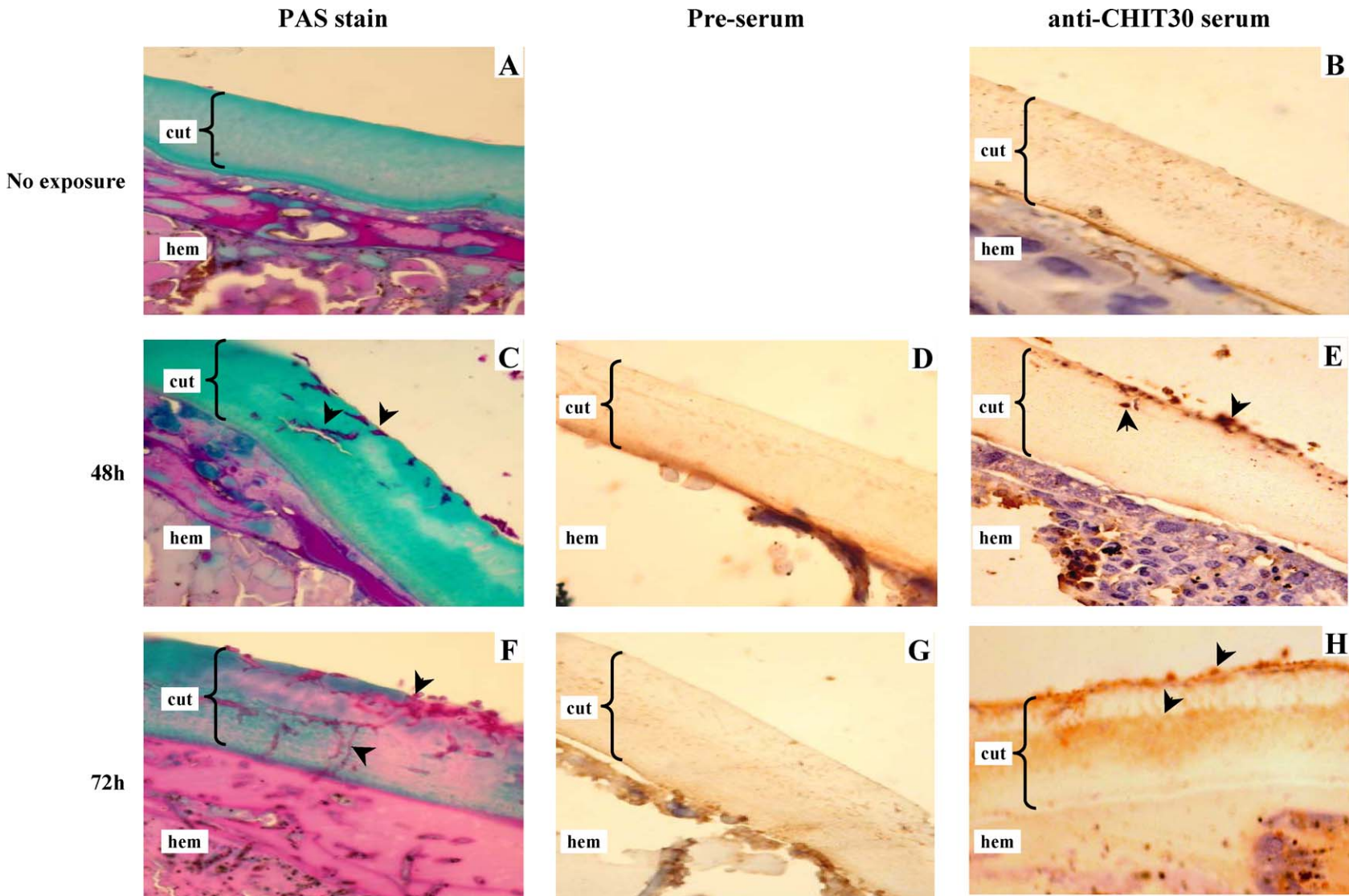


Fig. 4. In situ detection of chitinase CHIT30 produced by *M. anisopliae* var. *anisopliae* during tick cuticle penetration. Ingurgitated tick females were exposed to *M. anisopliae* E6 spores and histological sections were prepared; prior to exposure (no exposure, panels A and B); after 48 h (48 h, panels C, D and E) and after 72 h exposure (72 h, panels F, G and H). Three consecutive histological sections from each, control (no exposure) and infected ticks (after 48 and 72 h) were prepared as follows: PAS-green light stain (PAS stain, panels A, C and F) to evaluate fungal development; pre-immune serum reaction (pre-serum, panels D and G) to detect possible unspecific serum reaction, and anti-CHIT30 serum reaction (anti-CHIT30 serum, panels B, E and H). Arrows indicate: hypha development (panels C and F) or anti-CHIT30 serum reaction (E and H). Cuticle (cut) and hemocoel (hem) are indicated. Magnification $\times 400$.

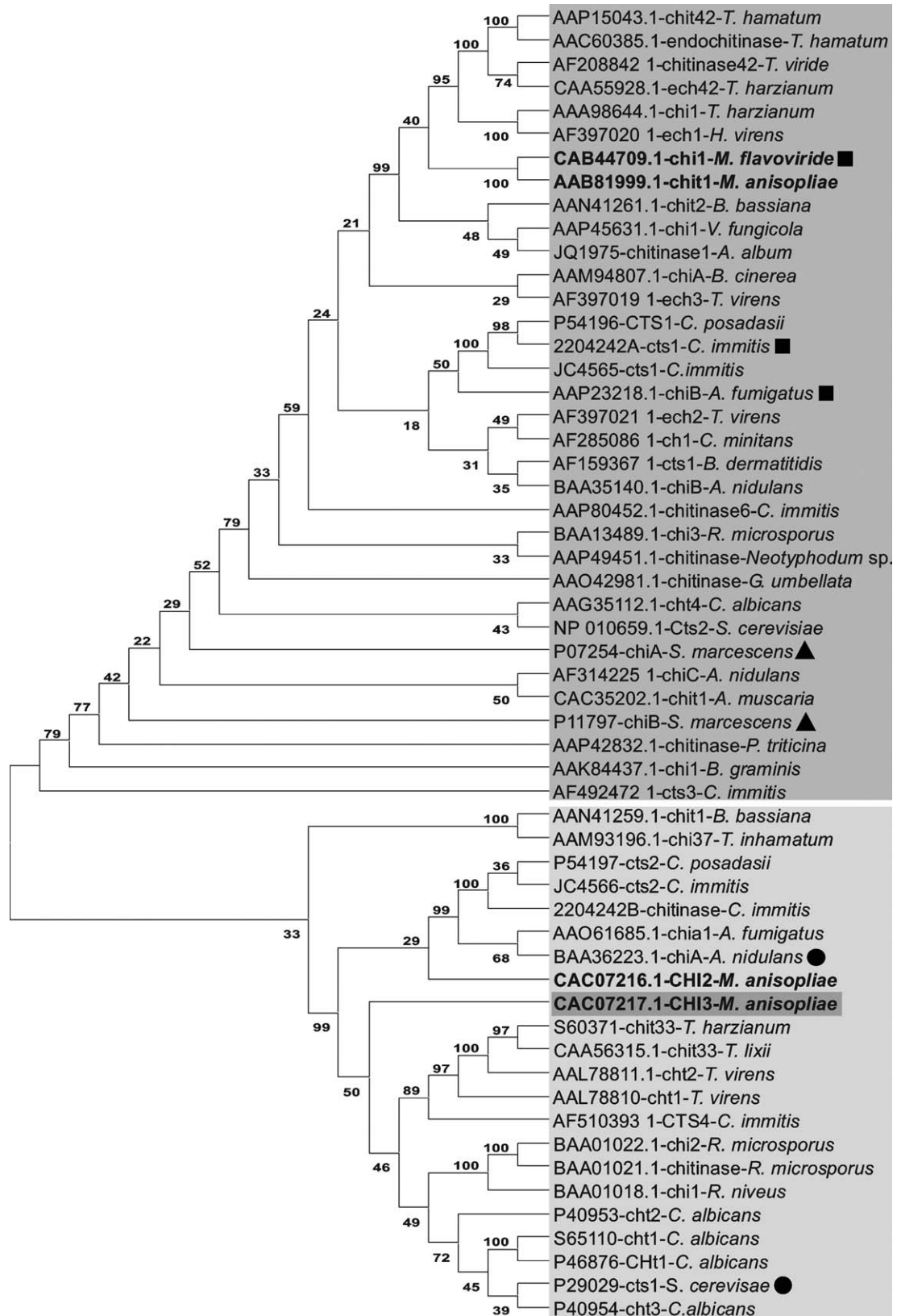


Fig. 5. Phylogenetic neighbor-joining tree of *M. anisopliae* var. *anisopliae* *chi3* deduced amino acid sequence. The accession numbers and species describe fungal CHIT30 orthologues. The gray boxes depict the clusters formed. *M. anisopliae* var. *anisopliae* *chi3* sequence is highlighted. Symbols: squares, genes suggested not to be involved with growth/morphogenesis; circles, genes experimentally demonstrated to be involved in growth/morphogenesis; triangles, bacterial genes. Tree confidence was confirmed by one thousand bootstraps.

CHIT30 serum yielding eleven positive clones. From these, five clones were identified and purified presenting identical restriction patterns and size: a 1200-bp DNA fragment, confirmed by DNA sequencing (**AY545982**). Using BlastX algorithm [1], these clones showed highest homology to a putative chitinase of *M. anisopliae* var. *acridum* (*chi3* gene product, **CAC07217.1**). Comparison of the putative amino acid sequence of *chi3* gene from *M. anisopliae* var. *anisopliae* with fungal orthologs revealed identities of 99 and 32% with putative endochitinases *chi3* (**CAC07217.1**) and *chi2* (**CAC07216.1**) gene products, respectively, both from *M. anisopliae* var. *acridum*; and 36% with chitinases of *Candida albicans* (**S65110**) and *Aspergillus nidulans* (**BAA36223.1**). The CHIT30 deduced amino acid sequence belonged to glycohydrolase family 18, according to the Pfam database [13].

In order to evaluate the evolutionary relationships among fungal chitinases and to classify the predicted chitinase CHIT30 (*chi3* gene) into bacterial-like or plant-like classes [23], we conducted a neighbor-joining phylogenetic tree with chitinase-deduced amino acid sequences from fungi and two representative bacterial genes. As shown in Fig. 5, the generated tree presented two large clusters, with the first (triangles) and fungal chitinases that have been experimentally shown not to be involved in hyphal architecture (squares). The second cluster was formed by fungal chitinases known to act in hyphal development (circles). The deduced *M. anisopliae chi3* gene amino acid sequence (chitinase CHIT30, highlight) was assembled into the former group.

To determine the organization of *chi3* sequences in the *M. anisopliae* genome, Southern blot analysis was performed with the DNA fragment of 1200 bp as a probe, indicating that the gene was present as a single copy (data not shown).

4. Discussion

The multiplicity of *M. anisopliae* chitinases provides a challenge in determining the role played by each particular enzyme in morphogenesis, in adaptation to a new environment, or in pathogenicity [3,27,29,36,38,47,50]. It is inferred that the production of enzymes that disrupt the integrity of the hosts will have a strong selective advantage for pathogens. Nevertheless, it is necessary to investigate the diversity of these enzymes and to determine which of the multiple activities is likely to be of most relevance to pathogenicity. Although the role of this complex mixture of enzyme activities during cuticle penetration is unknown, the endoacting enzymes are likely to be the most effective at solubilizing cuticle polymers, assisting penetration. The exochitinases may function to further degrade oligomers released by endochitinases, which provide nutrition. Chitinase CHIT30 is an endo/exoacting enzyme. In nature, such a mechanism would favor a rapid and complete degradation

of chitin microfibrils producing monomers for nutrition and inducing further enzyme synthesis. Chitin and proteins are the two major structural components of the arthropod cuticle. Therefore, it is expected that chitinases and proteases produced extracellularly by *M. anisopliae* [45] play an important role in biocontrol.

When *M. anisopliae* was cultured on chitin, at least five chitinases isozymes were secreted and visualized in glycol-chitin gels. Since it is not a substrate for exochitinase, glycol-chitin should detect only endochitinases [28]. Together with chitinase CHIT30, two other major endochitinases were secreted with molecular masses of ca. 43 and 60 kDa. Previously, we expressed in *E. coli* a chitinase encoded by the *chit1* gene from *M. anisopliae*, with estimated molecular mass of 42 kDa, characterized as an endochitinase [2]. According to St. Leger et al. [47], in *M. anisopliae* the predominant endochitinases are acidic and resolved into two major proteins (43.5 and 45 kDa) with identical N-terminal sequences and similar to an endochitinase from the mycoparasite *Trichoderma harzianum* [33]. Kang et al. [26,27] purified a 60-kDa endochitinase, encoded by the *chit11* gene from *M. anisopliae* with N-terminal sequences different from those of 43.5 and 45 kDa. However, because of striking similarity of the *chit11* gene with the *chiA* (*yheB*) gene from *E. coli*, the actual origin of the *Metarhizium* clone is likely a recombination artefact during cloning in *E. coli* [15].

Western blot analysis of total secreted protein from *M. anisopliae* induced and repressed cultures showed high levels of chitinase CHIT30 only when chitin, tick cuticle or low concentrations of GlcNAc (0.25%) were present. In contrast, cultures grown on glucose or high GlcNAc concentration (1%) had no detectable levels of chitinase CHIT30. Previously, we had shown that the *chit1* gene, cloned from the same *M. anisopliae* strain used here, presented similar regulation [6]. Our hypothesis is that the expression of both genes (*chit1* and *chi3*) is under a positive regulation mechanism: the presence of the inducer is necessary for expression. Even when cultures were grown for longer than 24 h, when glucose was exhausted from the medium, neither chitinase CHIT30 nor *chit1* transcripts were detectable (this work and [6], respectively).

The penetration mode of entomopathogenic fungi is suggested to be based upon a combination of mechanical pressure and enzymatic degradation. According to Goettel et al. [20], the epicuticle penetration is primarily by enzymatic degradation, while penetration of procuticle involves both enzymatic degradation and mechanical separation of the lamellae. Thus, temporal studies of the production and secretion of hydrolytic enzymes in arthropods could provide important information about the role of these enzymes in pathogenicity. Our present observations, using the PAS reaction, showed extensive *M. anisopliae* hyphae development within the procuticle and the transition between epi- and procuticle in *B. microplus* 48 h post-infection. Ultrastructural immunocytochemistry enabled CHIT1 detection

(45 kDa chitinase) during penetration of the caterpillar *Manduca sexta* cuticle [47]. Our analysis by light microscopy immunocytochemistry of chitinase CHIT30 showed that this endochitinase was also produced at low levels during the initial penetration of the tick *B. microplus* cuticle, as occurs for chitinase CHIT1 in *M. sexta*. Greater levels of chitinases accumulated after 48 h post-infection suggesting that CHIT30 production, like that of CHIT1, is dependent on its substrate accessibility. Recently, a representational difference analysis (RDA) methodology was applied to identify ESTs expressed by *M. anisopliae* during the early stages of tick *B. microplus* cuticle penetration. This analysis disclosed a range of genes upregulated during cuticle degradation and other genes involved in stress response, detoxification, trans-membrane transport and appressorium formation [11]. Among these sequences no chitinases were found, reinforcing the latter expression of chitinase genes in relation to proteases. Nevertheless, this does not suffice to rule out the essentiality of chitinases for the successful breach of the host cuticle barrier. As observed in the histological sections (Fig. 4), important alterations in the tick cuticle structure occur during infection mediated by *M. anisopliae*. These alterations, more evident 72-h post-infection, concentrate CHIT30 immunolabeling. It is known that other hydrolases, especially PR1 proteases, are produced at this stage [48], but most likely chitinase CHIT30 has a role in the overall cuticle alterations detected.

Amino acid sequence alignment of fungal chitinases and two representative bacterial chitinases rendered two groups. The first, the bacterial-like class, encompasses the *M. anisopliae* *chit1* gene [6], the *Trichoderma harzianum* *Ech42* gene [33], the *Aspergillus fumigatus* *chiB1* gene [24] and the *Coccidioides immitis* *cts1* gene [39]. Gene disruption of the *chiB1* gene from *A. fumigatus* [24] and of the *C. immitis* *cts1* gene [39] resulted in mutant strains identical in growth and morphogenesis to the wild-type *A. fumigatus* and no effects on endosporulation or on the virulence of *C. immitis* transformants were observed [39]. *M. anisopliae* *chi2* and *chi3* sequences collapsed in the second group of family 18 chitinases, the plant-like class, shown to have a morphogenetic role in *Saccharomyces cerevisiae* [31] and *Aspergillus nidulans* [52]. *A. nidulans* mutants, following disruption of the *chiA* gene, exhibited a decreased conidia germination frequency and lower hyphal growth rates [52]. The utilization of fungal chitinase sequences to predict a possible participation of individual enzymes in hyphal growth/morphogenesis or in nutrient acquisition/parasitism is still limited by the number of chitinase genes with experimentally confirmed functions. However, the separation of the analyzed sequences into two clusters that coincide with the grouping of chitinase genes according to their proposed function suggests that such a prediction could be possible. Nevertheless, the isolation of chitinase null mutants and analysis of expression during parasitism or hyphal architecture is still crucial to ascertaining the function of these gene products.

The role of cloned *M. anisopliae* chitinase CHIT30 will be further investigated. One approach is via gene silencing; however, this approach might not be informative because redundancy of these proteins is likely. Another approach is to determine the subcellular localization of this chitinase during the host infection process.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian grants and fellowships from: Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). M.V.S. and L.S. are recipients of scholarships from CNPq and C.C.S. from CAPES. We thank Dr. Arthur Fett Neto for critically reading the manuscript.

References

- [1] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [2] C.M. Baratto, M.V. Silva, L. Santi, L. Passaglia, I.S. Schrank, M.H. Vainstein, A. Schrank, Expression and characterization of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* 42 kDa chitinase in *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.* 49 (2003) 723–726.
- [3] C.C. Barreto, C.C. Staats, A. Schrank, M.H. Vainstein, Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion, *Curr. Microbiol.* 48 (2004) 102–107.
- [4] V.R.E.P. Bittencourt, A.G. Mascarenhas, J.L.H. Faccini, Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais, *Ciência Rural.* 29 (1999) 351–354.
- [5] H. Blum, H. Beier, H. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8 (1987) 93–99.
- [6] M.R. Bogo, C.A. Rota, H. Pinto Jr., M. Ocampos, C.T. Correa, M.H. Vainstein, A. Schrank, A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA, *Curr. Microb.* 37 (1998) 221–225.
- [7] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [8] A.K. Charnley, R.J. St. Leger, The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects, in: E.T. Cole, H.C. Hoch (Eds.), *Fungal Spore Disease Initiation in Plants and Animals*, Plenum, New York, 1991, pp. 267–287.
- [9] J.M. Clarkson, A.K. Charnley, New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.* 4 (1996) 197–204.
- [10] A.C.B. Correia, A.C. Foirin, A.C. Monteiro, C.J. Verissimo, Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle, *J. Invertebr. Pathol.* 71 (1998) 189–191.
- [11] V. Dutra, L. Nakazato, L. Broetto, I.S. Schrank, M.H. Vainstein, A. Schrank, Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle, *Res. Microbiol.* 155 (2004) 245–251.

- [12] F. Driver, R.J. Milner, J.W.H. Trueman, A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data, *Mycol. Res.* 104 (2000) 134–150.
- [13] L. Falquet, M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C.J. Sigrist, K. Hofmann, A. Bairoch, The PROSITE database, its status in 2002, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 235–238.
- [14] P.A. Felse, T. Panda, Regulation and cloning of microbial chitinase genes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 141–151.
- [15] O. Francetic, C. Badaut, S. Rimsky, A.P. Pugsley, The ChiA (YheB) protein of *Escherichia coli* K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 1506–1517.
- [16] A.P.G. Frazzon, I.S. Vaz Jr., A. Masuda, A. Schrank, M.H. Vainstein, In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*, *Vet. Parasitol.* 94 (2000) 117–125.
- [17] F.M. Freimoser, S. Screen, S. Bagga, G. Hu, R.J. St. Leger, Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts, *Microbiology* 149 (2003) 239–247.
- [18] A.K. Gillespie, Use of fungi to control pests of agricultural importance, in: M.N. Burge (Ed.), *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester Univ. Press, Manchester, 1988, pp. 37–60.
- [19] M.P. Giménez-Pecci, M.R. Bogo, L. Santi, C.K. Moraes, C.T. Corrêa, M.H. Vainstein, A. Schrank, Characterization of mycovirus and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*, *Curr. Microbiol.* 45 (2002) 334–339.
- [20] M.S. Goettel, R.J. St. Leger, N.W. Rizzo, R.C. Staples, W. Roberts, Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 2233–2239.
- [21] G.W. Gooday, Aggressive and defensive roles for chitinases, in: P. Jollès, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitin and Chitinases*, Basel, Switzerland, Burkhäuser, 1999, pp. 157–169.
- [22] V.M. Hearn, G.M. Escott, E. Glyn, V. Evans, D.J. Adams, Complex chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*, *Microbios* 93 (1998) 85–104.
- [23] B. Henrissat, Classification of chitinases modules, in: P. Jollès, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitin and Chitinases*, Basel, Switzerland, Burkhäuser, 1999, pp. 137–156.
- [24] A.K. Jaques, T. Fukamizo, D. Hall, R.C. Barton, G.M. Escott, T. Parkinson, C.A. Hitchcock, T.J. Adams, Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product, *Microbiology* 149 (2003) 2931–2939.
- [25] G.P. Kaaya, E.M. Mwangi, E.A. Ouna, Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, *J. Invertebr. Pathol.* 67 (1996) 15–20.
- [26] S.C. Kang, S. Park, D.G. Lee, Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 165 (1998) 267–271.
- [27] S.C. Kang, S. Park, D.G. Lee, Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, *J. Invertebr. Pathol.* 73 (1999) 267–271.
- [28] D. Koga, K.J. Kramer, Hydrolysis of glycol chitin by chitinolytic enzymes, *Comp. Biochem. Physiol.* 76 (1983) 291–293.
- [29] C. Krieger de Moraes, A. Schrank, M.H. Vainstein, Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*, *Curr. Microbiol.* 46 (2003) 205–210.
- [30] S. Kumar, K. Tamura, I.B. Jakobsen, M. Nei, MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics* 17 (2001) 1244–1245.
- [31] M.J. Kuranda, P.W. Robbins, Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19758–19767.
- [32] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–683.
- [33] M. Lorito, G.E. Harman, C.K. Hayes, R.M. Broadway, S.L. Woo, A. Pietro, Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: II. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase, *Phytopathology* 83 (1993) 302–307.
- [34] J. Molano, J. Polacheck, A. Duran, C. Cabib, An endochitinase from wheat germ, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4901–4907.
- [35] A.C. Monteiro, A.C. Fiorin, A.C.B. Correia, Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions, *Revista de Microbiologia* 29 (1998) 109–112.
- [36] A.S. Pinto, C.C. Barreto, A. Schrank, C.J. Ulhoa, M.H. Vainstein, Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, *Can. J. Microbiol.* 43 (1997) 322–327.
- [37] E.B. Prophet, B. Mills, J.B. Arrington, L.H. Sobin, Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, 1992, p. 1274.
- [38] D.M. Rast, D. Baumgartner, C. Mayer, G.O. Hollenstein, Cell wall-associated enzymes in fungi (review), *Phytochemistry* 64 (2003) 339–366.
- [39] U. Reichard, C.Y. Hung, P.W. Thomas, G.T. Cole, Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*, *Infect Immun.* 68 (2000) 5830–5838.
- [40] J. L. Reissig, J.L. Strominger, L.F. Leloir, A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars, *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 959–967.
- [41] J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [42] G.M. Scott, V.M. Hearn, D.V. Adams, Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*, *Microbiology* 144 (1998) 1575–1581.
- [43] S.E. Screen, G. Hu, R.J. St. Leger, Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*, *J. Invertebr. Pathol.* 78 (2001) 260–266.
- [44] P.A. Shah, J.K. Pell, Entomopathogenic fungi as biological control agents—mini-review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (2003) 413–423.
- [45] R.J. St. Leger, A.K. Charnley, R.M. Cooper, Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle, *J. Invertebr. Pathol.* 47 (1986) 295–302.
- [46] R.J. St. Leger, L. Joshi, M. Bidochka, D.W. Roberts, Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle, *Mycol. Res.* 99 (1995) 1034–1040.
- [47] R.J. St. Leger, L. Joshi, M.J. Bidochka, N.W. Rizzo, D.W. Roberts, Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 907–912.
- [48] R.J. St. Leger, L. Joshi, M.J. Bidochka, D.W. Roberts, Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1996) 6349–6354.
- [49] R.J. St. Leger, R.C. Staples, D.W. Roberts, Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes, *J. Invertebr. Pathol.* 61 (1993) 81–84.
- [50] R.J. St. Leger, R.M. Cooper, A.K. Charnley, Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *J. Invertebr. Pathol.* 58 (1991) 415–426.
- [51] J. Trudel, A. Asselin, Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 178 (1989) 362–366.

- [52] N. Takaya, D. Yamazaki, H. Horiuchi, A. Ohta, M. Takagi, Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 60–65.
- [53] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.
- [54] S.P. Wraight, M.A. Jackson, S.L. Kock, Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents, in: T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CAB International, Wallingford, 2001, pp. 253–287.

10. ANEXO II

Artigo “Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* da autoria de Duarte RT, **Staats CC**, Fungaro MH, Schrank A, Vainsten MH, Furlaneto-Maia L, Nakamura CV, de Souza W, Furlaneto MC, publicado no periódico Letters in Applied Microbiology, N.44, PP. 248-254 no ano de 2007.

ORIGINAL ARTICLE

Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*

R.T.D. Duarte¹, C.C. Staats², M.H.P. Fungaro¹, A. Schrank², M.H. Vainsten², L. Furlaneto-Maia^{1,3}, C.V. Nakamura⁴, W. de Souza⁵ and M.C. Furlaneto¹

1 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brazil

2 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

3 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, Brazil

4 Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brazil

5 Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

Agrobacterium attachment, *Agrobacterium tumefaciens*, benomyl resistance, *Metarhizium anisopliae* var.

Correspondence

Márcia C. Furlaneto, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL PO Box 6001, Londrina-PR 86051-990, Brazil. E-mail: furlaneto@uel.br

2006/0701: received 17 May 2006, revised 12 September 2006 and accepted 12 October 2006

doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02092.x

Abstract

Aims: To examine the ability of *Agrobacterium* to attach to *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* strain CG423 under co-cultivation and to develop an *Agrobacterium*-mediated method of gene delivery into strain CG423, a promising agent for biological control of grasshoppers.

Methods and Results: The co-cultivation of *Agrobacterium tumefaciens* and *M. anisopliae* var. *acidum* was analysed under scanning electron microscopy. We observed that *Agrobacterium* attached to and formed aggregates around *Metarhizium* conidia and germ tubes. We also observed the occurrence of fibril-like structures connecting neighbouring bacterial–fungal cells. The *Agrobacterium*-mediated transformation was applied using two binary vectors carrying a benomyl resistance gene as a selection marker. The efficiency of transformation was up to 53 transformants per 10⁵ target conidia. High mitotic stability of the transformants (89–97%) was demonstrated after five successive transfers on non-selective media. Molecular analysis revealed the occurrence of high frequency of gene conversion.

Conclusions: In our study, we report that *A. tumefaciens* strain AGL-1 attaches to and genetically transforms the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*.

Significance and Impact of the Study: We report for the first time, the attachment of *Agrobacterium* to fungal cells opening new avenues for the study of this essential step of the T-DNA transfer process. Considering the efficiency of the transformation protocol herein described, this is a useful tool for gene disruption in *M. anisopliae* var. *acidum*.

Introduction

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* is regarded as one of the most promising agents for biological control of grasshoppers (Prior *et al.* 1992). In Brazil, a biocontrol programme has been assembled for the purpose of developing a native strain (CG423) of

M. anisopliae var. *acidum* as a bioinsecticide against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* (Magalhães 1997) which until recently has been a major problem in central Brazil causing severe agricultural losses.

The development of a reliable and efficient transformation system for *M. anisopliae* var. *acidum* is important for the elucidation of gene function related to pathogenicity

and virulence, in turn opening up the possibility of targeted molecular improvements for the purpose of biological control. In recent years, fungal transformation has progressed substantially due to the development of an approach based on the ability of the *Agrobacterium tumefaciens* to transfer DNA to filamentous fungi (reviewed in Michielse *et al.* 2005b). *Agrobacterium tumefaciens* has the ability to transfer part of plasmid-borne DNA (T-DNA) to plants. This mechanism requires the presence of the virulence (*vir*) region located on the tumour-inducing plasmid which encodes most components of the protein apparatus for T-DNA transfer and several chromosomal virulence genes (*chv*), involved in the early stages of *Agrobacterium* attachment to the plant cells (reviewed in Tzfira and Citovsky 2000). The *A. tumefaciens*-mediated transformation (AMT) approach has been shown to be an important alternative to other fungal transformation methods as it renders high number of transformants, is easier to perform, does not require special equipment and provides high percentage of homologous recombination (Dobinson *et al.* 2004; Michielse *et al.* 2005a).

In this study, we report for the first time, the attachment of *Agrobacterium* to fungal cells and an efficient protocol for the AMT of *M. anisopliae* var. *acidum*. This transformation approach would represent a useful tool for genetic studies in *M. anisopliae* var. *acidum*.

Materials and methods

Strains and plasmids

The *M. anisopliae* var. *acidum* strain CG423 was obtained from the Cenargen/Embrapa collection of entomopathogenic fungi (Brasilia/DF, Brazil). *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 was kindly provided by Dr Peter Romaine (The Pennsylvania State University, USA). Two different constructs, based on the plasmid pBT6 (Orbach *et al.* 1986), were used in the experiments. The binary vectors denoted pBINT6 and pCAB3100 were constructed by insertion of a 3.1-kb *Hind*III fragment from pBT6, between T-DNA border sequences of the vectors pBIN19 (Bevan 1984) and pZP-201BK (Covert *et al.* 2001) respectively. This fragment contains the structural β -tubulin gene (*bml*) from a benomyl-resistant strain of *Neurospora crassa*. *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 was transformed with the binary vectors by a heat-shock method.

Electron microscopic analysis of the co-cultivated pair

The co-cultivation of *A. tumefaciens* and *M. anisopliae* var. *acidum* was analysed under scanning electron microscopy. An overnight culture of AGL-1 harbouring the vector pBINT6 was grown at 28°C in liquid LB (Luria-

Bertani) medium (Sambrook and Russel 2001) supplemented with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of streptomycin. The mid-log phase culture ($\text{OD}_{660} = 0.6$) was centrifuged at 9000 g for 5 min at 4°C and cells were resuspended in induction medium (IM) (Reis *et al.* 2004) to a final concentration of 10^8 cells ml^{-1} . Fungal conidia were harvested from sporulated cultures grown on agar plates with complete medium (CM) (Pontecorvo *et al.* 1953) and resuspended in the same liquid medium to a final concentration of 10^6 conidia per ml. The co-cultivation was performed by the addition of 100 μl of each suspension in 24-well plate containing 13-mm diameter cover glasses. The mix volume was adjusted to 1 ml by the addition of IM medium with or without 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ acetosyringone (AS). After co-cultivation at 28°C for 9 h the cover glasses were washed twice with sterile distilled water followed by 2.5% glutaraldehyde fixation at room temperature for 2 h. Post-fixation was carried out for 30 min at 28°C with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 0.8% potassium ferricyanide and 5 mmol l^{-1} CaCl_2 . Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO_2 , coated with carbon in a Balzers system (MED 010) (Baltec, Liechtenstein, Switzerland) and viewed in a JEOL-JSM-6340F Field Emission Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Images were obtained using secondary electrons.

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation

Transformation of *M. anisopliae* var. *acidum* was carried out as described by Reis *et al.* (2004) with modifications. *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 harbouring the binary vectors was grown at 28°C for 18 h in liquid LB medium supplemented with appropriate antibiotics. The culture was diluted to OD_{660} of 0.15 in 20 ml of IM medium containing 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ AS. The cells were grown under the same conditions to reach OD_{660} of 0.6. Co-cultivation between *A. tumefaciens* and *M. anisopliae* var. *acidum* conidia was performed by adding 100 μl of bacterial culture to 100 μl of fungal conidia suspension (1×10^6 conidia per ml). The mix was plated onto nitro-cellulose filters (0.45- μm pore and 90-mm diameter; MFS-Japan, Tokyo, Japan) on a co-cultivation medium (IM medium) with or without 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ AS. Following co-cultivation at 28°C for 36 h, 5 ml of molten CM agar supplemented with benomyl (13 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and mefoxin (150 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were poured over the plates as an overlay for the selection of fungal transformants and to inhibit *A. tumefaciens* growth respectively. Each putative transformants was transferred to CM agar amended with 13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of benomyl and incubated as described.

Mitotic stability and resistance analysis

To determine mitotic stability all putative transformants were cultured on CM agar devoid of benomyl. Following growth, conidia of each of the transformants were transferred onto fresh CM. This procedure was repeated five times. Then, conidia of each of the transformants were transferred onto CM agar amended with 13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of benomyl. The resistance to benomyl was tested by the growth of transformants on CM amended with different concentrations of the fungicide (13, 25, 50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Plates were incubated at 28°C for 7 days.

DNA isolation and molecular analysis

Fungal genomic DNA was obtained from mycelia grown in liquid CM for 2 days at 28°C on a rotatory shaker. DNA was extracted according to the method of Reis *et al.* (2004). PCR analysis of 50 putative transformants was performed using the primer pair TubF (5'-GTAAC-CAAATCGGTGCTGCT-3') and TubR (5'-CGACGGAG-AATGTAGCCATC-3'). The primers amplify a 660-bp DNA fragment from the *N. crassa bml* gene and a 570-bp fragment from the endogenous *M. anisopliae* β -tubulin gene. The reaction had a final volume of 20 μl containing 0.2 mmol l^{-1} each of the four dNTPs, 20 pmol l^{-1} of each primer, 10 ng of extracted DNA and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (CENBIOT, Porto Alegre, Brazil) with appropriate reaction buffer. All amplifications were performed in a thermocycler (Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg, Germany) programmed to an initial denaturing cycle of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min and 72°C for 1 min. Amplification products were analysed by electrophoresis on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

For Southern analysis of transformants, *Eco*RI-restricted DNA fragments (*Eco*RI cuts T-DNA outside of the fragment used as DNA probe) were size-fractionated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and capillary blotted onto Hybond-N+ membrane (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) using standard techniques (Sambrook and Russel 2001). Hybridization was performed under conditions recommended for the digoxigenin (DIG) hybridization system by Roche (Mannheim, Germany) using a 660 bp DIG-labelled DNA probe from the *N. crassa bml* gene.

Results

Analysis of the co-cultivated pair

We examined the ability of *Agrobacterium* strain AGL-1 to attach to *M. anisopliae* var. *acridum* strain CG423 under

co-cultivation. As shown in Fig. 1a,b, *Agrobacterium* attached to and formed aggregates around *Metarhizium* conidia and germ tubes. We also observed the occurrence of fibril-like structures connecting neighbouring bacterial–fungal cells (Fig. 1c,d). These structures were observed either in the presence or in the absence of AS, and measured 82 nm (± 12 nm) in width.

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation

The suitability of the AMT method for the transformation of *M. anisopliae* var. *acridum* using conidia as starting cells and the benomyl resistance gene as a selective trait has been studied.

The putative transformants emerged from the selective medium as distinct colonies within 7–21 days incubation if co-cultivation was performed in medium containing inducer AS. The transformation frequencies achieved for *Metarhizium* strain CG423 using *A. tumefaciens* strain AGL-1, harbouring vectors pBINT6 and pCAB3100, are shown in Table 1. The employment of the plasmid pCAB3100 resulted in higher number of transformants compared with that of pBINT6. Plasmid pCAB3100 is derived from the small pPZP201 vector family, which occurs in high copy number (Haidukiewicz *et al.* 1994), and its T-DNA encompasses the *N. crassa* benomyl resistance gene (*bml*). On the other hand, the pBINT6 plasmid is derived from pBIN19, which is a larger and low copy number plasmid. Furthermore, the T-DNA of pBINT6 plasmid contains several genes besides the *bml* gene (Bevan 1984).

Stability and molecular analysis of transformants

All putative transformants obtained from each vector were repeatedly transferred to non-selective medium so as to investigate the mitotic stability of the integrated T-DNA. Following five rounds of growth on non-selective medium (with no benomyl added) clones were transferred to the selective medium. Mitotic stability in the order of 90–100% was observed (Table 1). The transformants of *M. anisopliae* var. *acridum* never produced sectors (data not shown). Furthermore, they were able to grow on increasing concentrations of benomyl (up to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Transgene integration was showed by PCR using oligonucleotides (TubF and TubR) based on fungal β -tubulin gene sequences. This PCR strategy allowed the discrimination between *N. crassa* (benomyl resistance gene, 660-bp amplicon) and *M. anisopliae* (570-bp amplicon) β -tubulin genes, due to intron size and number differences. Some 66% of the transformants analysed (33 of 50) showed a single amplicon corresponding to the *N. crassa* gene (Fig. 2 lanes 3–6), suggesting the occurrence of integration by

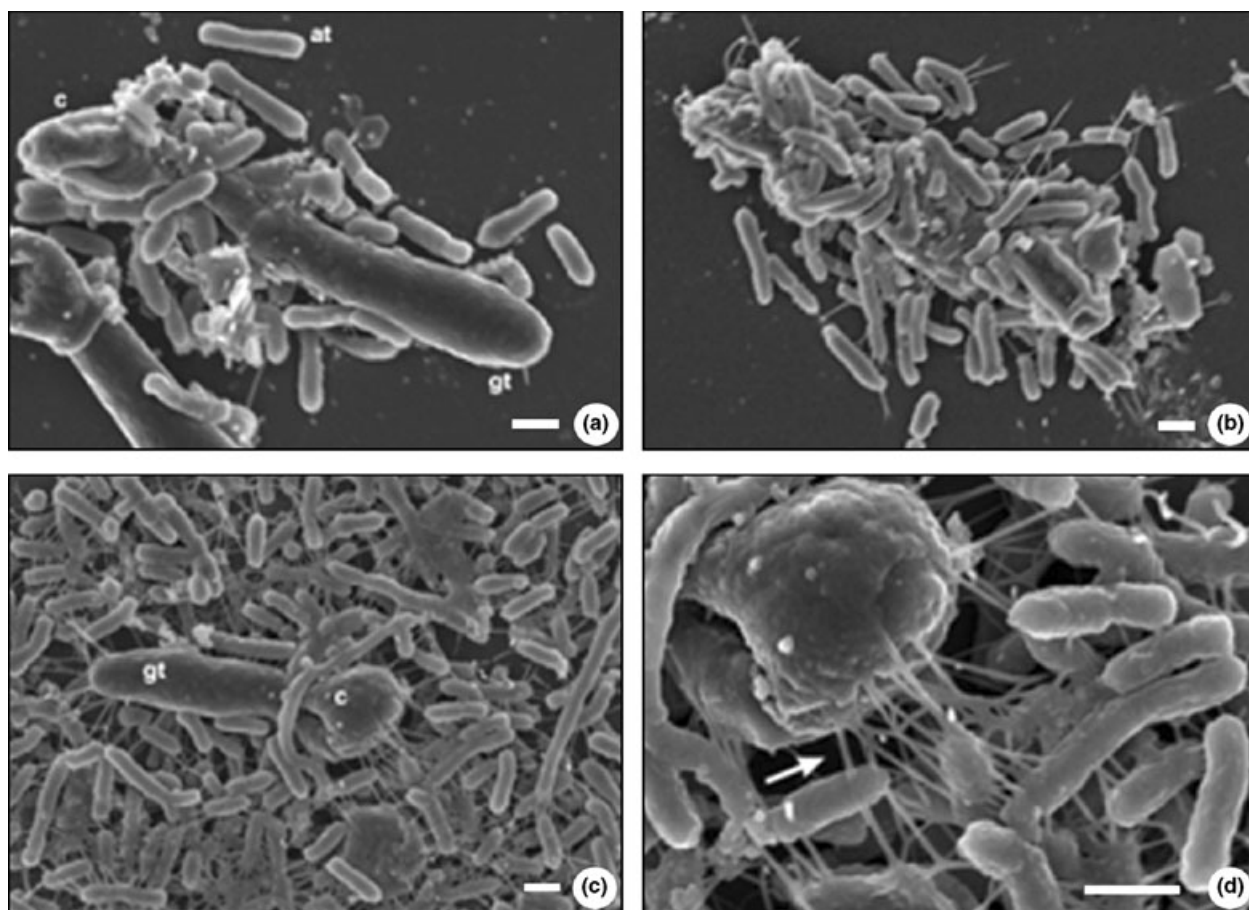


Figure 1 *Agrobacterium tumefaciens* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* interaction under co-cultivation at a field emission scanning electron microscope. (a,b) show the attachment of *Agrobacterium* with aggregates at and around the host cells; (c,d) show the presence of fibril-like structures (arrow) connecting neighbouring cells. at, *Agrobacterium tumefaciens*; c, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia; gt, germinative tube (bars = 1 μm).

Table 1 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia with the benomyl resistance gene, *bml*, and the resulting stability of transformants

Plasmid present in <i>A. tumefaciens</i> strain AGL-1	AS*	Number of Ben ^R transformants†			Percentage of mitotically stable transformants‡
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
pBINT6	+	10	07	19	89
	–	0	0	0	
pCAB3100	+	39	45	53	97
	–	0	0	0	

*Co-cultivations were carried out in the presence (+) or in the absence (–) of 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ acetosyringone (AS).

†Each number represent an independent transformation experiment.

‡Mitotic stability was based on growth in the presence of benomyl (13 $\mu\text{g ml}^{-1}$) after five serial transfers on non-selective medium (complete medium).

the recombination of *bml* gene in the T-DNA with the native *M. anisopliae* β -tubulin gene. The remaining transformants yielded two amplicons (Fig. 2 lanes 7–10), suggesting ectopic T-DNA integration events. The integra-

tion of the T-DNA into the genome was confirmed by Southern blot analysis, using chromosomal DNA from transformants and wild-type digested with *EcoRI*. The transformants in which homologous recombination

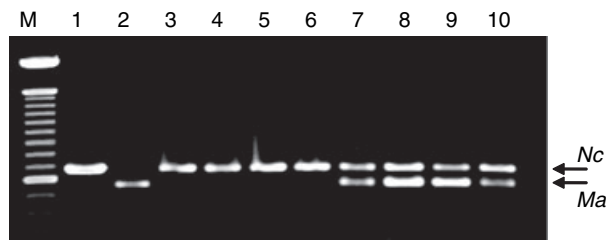


Figure 2 The T-DNA integration of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* transformants. PCR analysis of *Neurospora crassa* β -tubulin gene integration. Control pBT6 plasmid amplicon (lane 1), amplicons from *M. anisopliae* var. *acridum* wild-type (lane 2) and randomly selected benomyl-resistant transformants using the binary vector pCAB3100 (lanes 3–10). PCR analysis was carried out using genomic DNA and primers TubF and TubR. M, DNA molecular size markers (100 bp); Nc, *N. crassa* β -tubulin gene amplicon; Ma, *M. anisopliae* β -tubulin gene amplicon.

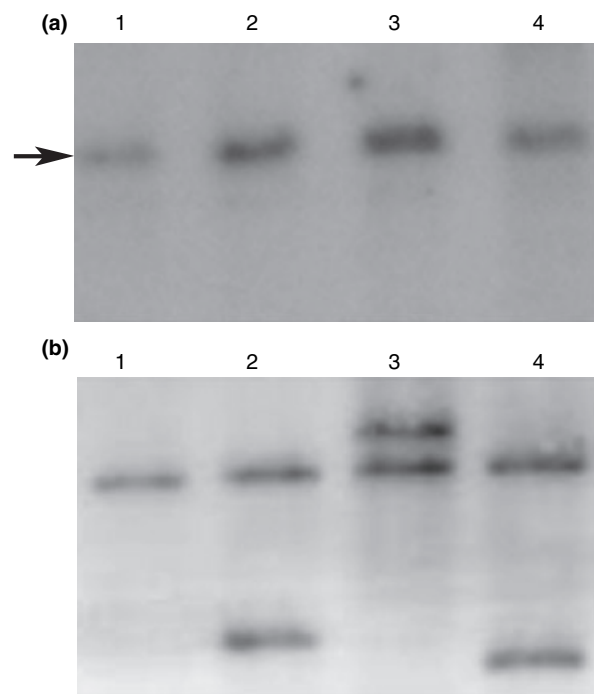


Figure 3 Southern blot analysis of wild-type CG423 (lane 1) and benomyl-resistant strains originated from *Agrobacterium*-mediated transformation with plasmid pCAB3100. Genomic DNA (5 μ g) was digested with *Eco*RI and probed with the 660 bp digoxigenin-labelled DNA probe from the *Neurospora crassa* *bml* gene. (a) Transformants in which homologous recombination occurred (lanes 2–4). (b) Transformants in which integration was ectopic (lanes 2–4) as detected by PCR. The arrow indicates 3.6-kb hybridization band originating from a double crossing-over event between the T-DNA and the wild-type β -tubulin gene.

occurred, the probe hybridized to a single DNA fragment of 3.6-kb in size giving a pattern indistinguishable from the wild-type control (Fig. 3a, lanes 2–4). As expected,

additional DNA fragments hybridized to the probe when using DNA from transformants in which integration was ectopic as detected by PCR (Fig. 3b, lanes 2–4). Each of the transformants showed bands of hybridization corresponding to the integration of T-DNA in different sites of the genome.

Discussion

Agrobacterium tumefaciens recognition and attachment to the host cells is an early and essential step of the T-DNA transfer process. Similar to what has been found in *Agrobacterium*–plant interaction (Matthysse *et al.* 1981) we observed the occurrence of bacterial aggregates at and around the conidia and germ tubes. The occurrence of fibril-like structures connecting neighbouring bacterial–fungal cells (Fig. 1c,d) seems to be independent of the presence of AS as they were observed either in the presence or in the absence of this phenolic compound which is an inducer of *Agrobacterium* virulence genes as noted by Gelvin (2000). According to Fullner *et al.* (1996) the agrobacteria, whose *vir* genes are induced by AS, can form surface protein structures which are presumably involved in the transfer of T-DNA to plant cells. Chumakov *et al.* (2001) described the production of microfibrils by agrobacteria when in contact with plant cells (wheat seedlings) or with each other. Currently, close examination of *A. tumefaciens* cells paired with host cells other than plant cells is limited to *Streptomyces lividans* cells (Kelly and Kado 2002) and human cells (Kunik *et al.* 2001).

Our success in the AMT of *M. anisopliae* var. *acridum* strain CG423 is an additional, independent confirmation of this method in the transformation of filamentous fungi. The employment of the binary vector pCAB3100 yielded up to 53 transformants per 1×10^5 conidia. Previous transformation of *Metarhizium* strain CG423 using protoplast-PEG (polyethylene glycol) method yielded up to 3.6 transformants per μ g plasmid DNA per 10^7 protoplasts (Furlaneto *et al.* 1999), while using the micro-projectile bombardment procedure yielded up to 50 transformants per 1×10^9 conidia (Inglis *et al.* 2000). Our data demonstrate the advantage of using *Agrobacterium* as a tool in *M. anisopliae* var. *acridum* transformation, as this method circumvents the time-consuming protoplast isolation and the need of the particle bombardment equipment.

The negative control experiment, co-cultivation without the addition of AS, resulted in the absence of transformant *M. anisopliae* var. *acridum* colonies in selective medium indicating that the addition of AS was essential for the transformation (Table 1). The plant phenolic AS is not produced by fungi, its addition is essential for successful *Agrobacterium*-mediated fungal transformation (De Groot *et al.* 1998).

An assessment of the mitotic stability showed that most of the transformants (89–97%) tested remained mitotically stable, maintaining their benomyl resistance after being cultured in the absence of benomyl. This mitotic stability is consistent with T-DNA integration into chromosomal DNA.

The PCR strategy employed in this study revealed high frequency of gene conversion (65%) by homologous recombination between the *N. crassa bml* gene and the native *M. anisopliae* var. *acridum* β -tubulin gene among the transformants analysed. Similar result was observed by Bogó *et al.* (1996). Although high level of homology among fungal β -tubulin has been described (Cooley and Caten 1993), the number of introns and their sizes are different (Bogó *et al.* 1996). The employment of appropriated oligonucleotides such as TubF and TubR (see *Materials and methods*) can be used to distinguish among β -tubulin-related genes.

Integration of the T-DNA via homologous recombination, which may be applied as a strategy for gene disruption or enhancing gene expression, has recently been observed in filamentous fungi (Zeilinger 2004; Michielse *et al.* 2005a).

Considering the efficiency of the AMT protocol herein described, this approach would represent a useful tool for genetic studies in *M. anisopliae* var. *acridum* by enabling gene knock-out and the analysis of genes with unknown functions.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/Uel – Brazil. R.T.D.D. and C.C.S. are fellowship holders of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**, 8711–8721.
- Bogó, M.R., Vainstein, M.H., Aragao, F.J.L., Rech, E. and Schrank, A. (1996) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 123–127.
- Chumakov, M.I., Dykman, L.A., Bogatyrev, V.A. and Kurbanova, I.V. (2001) Investigation of the cell surface structures of *Agrobacteria* involved in bacterial and plant interactions. *Microbiology* **70**, 232–238.
- Cooley, R.N. and Caten, C.E. (1993) Molecular analysis of the *Septoria nodorum* β -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. *Mol Gen Genet* **237**, 58–63.
- Covert, S.F., Kappor, P., Lee, M., Briley, A. and Nairn, C.J. (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res* **105**, 259–264.
- De Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J. and Beijersbergen, A.G.M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**, 839–842.
- Dobinson, K.F., Grant, S.J. and Kang, S.K. (2004) Cloning and target disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr Genet* **45**, 104–110.
- Fullner, K.J., Lara, J.C. and Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**, 1007–1009.
- Furlaneto, M.C., Paião, F.G., Pinto, F.G.S. and Fungaro, M.H.P. (1999) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. *Can J Microbiol* **45**, 875–878.
- Gelvin, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 223–256.
- Haidukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* **25**, 989–994.
- Inglis, P.W., Aragão, F.J.L., Frazão, H., Magalhães, B.P. and Valadares-Inglis, M.C. (2000) Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol Lett* **191**, 249–254.
- Kelly, B.A. and Kado, C.I. (2002) *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. *Mol Plant Pathol* **3**, 125–134.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1871–1876.
- Magalhães, B.P. (1997) Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In *Progress in Microbial Ecology* ed. Martins, M.T., Sato, M.I.Z., Tiedje, J.M., Hagler, L.C.N., Dobereiner, J. and Sanchez, P.S. pp. 429–433. Santos: Brazilian Society for Microbiology/ ICOMÉ.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H.G. (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol* **145**, 583–595.
- Michielse, C.B., Arentshorst, M., Ram, A.F.J. and van den Hondel, C.A.M.J.J. (2005a) *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genet Biol* **42**, 9–19.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. and Ram, A.F. (2005b) *Agrobacterium*-mediated transfor-

- mation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* **48**, 1–17.
- Orbach, M.J., Porro, E.B. and Yanofsky, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for β tubulin from a benomyl resistance mutant of *Neurospora crassa* and its use as dominant marker. *Mol Cell Biol* **6**, 2452–2461.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemons, L.M., MacDonald, K.D. and Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141–238.
- Prior, C., Lomer, C.J., Herren, H., Paraiso, A., Kooyman, C. and Smit, J.J. (1992) The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locusts and grasshoppers. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers* ed. Lomer, C.J. and Prior, C. pp. 8–20. Wallingford, UK: CAB International.
- Reis, M.C., Fungaro, M.H.P., Duarte, R.T.D., Furlaneto, L. and Furlaneto, M.C. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Microbiol Methods* **58**, 197–202.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2000) From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol Plant Pathol* **1**, 201–212.
- Zeilinger, S. (2004) Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* **45**, 54–60.