

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO FUNCIONAL DA QUITINASE ChiMaA4 DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Trabalho de Conclusão de Curso

Thaiane Rispoli

Porto Alegre, 2013

**ESTUDO FUNCIONAL DA QUITINASE ChiMaA4 DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Thaiane Rispoli

Orientador: Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS. O trabalho teve suporte financeiro das agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Augusto Schrank pela oportunidade, confiança, amparo e pelos ensinamentos científicos que me foram transmitidos no momento da realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor Charley Staats pela sua atenção e auxílio durante a realização deste trabalho.

Agradeço a Ângela Junges, minha “tutora” pela dedicação, pela convivência, pelo auxílio, pelos ensinamentos que foram e serão muito importantes para a minha vida pessoal e profissional.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (217): Aline, Ângela, Eder, Nicolau e Rana pela convivência, auxílio, atenção, conselhos que foram muito importante para meu aprendizado.

Agradeço aos colegas dos laboratórios 220 e 222 pela convivência e auxílio durante o período de minha iniciação científica.

Agradeço a Teresinha pelo importante trabalho que realiza no Centro de Biotecnologia.

Agradeço às minhas queridas amigas e colegas: Amanda, Cristine, Mayara e Luiza pela grande amizade, companheirismo, paciência, respeito durante esses quatro anos de graduação. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes, mesmo quando tudo parecia uma tempestade. Obrigada por tudo!

Agradeço a minha família, por todo o apoio e amor incondicional. Amo vocês!

Agradeço ao meu noivo, Eduardo, pelo amor constante, paciência, compreensão, pelo apoio emocional, incentivo e confiança. Obrigada por estar do meu lado sempre. Te Amo!

Agradeço a todos os funcionários do Centro de Biotecnologia e a todas as pessoas que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1.	<i>Metarhizium anisopliae</i> COMO MODELO DE ESTUDO.....	3
2.2.	PROCESSO DE INFECÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
2.3.	QUITINASES EM FUNGOS FILAMENTOSOS	7
2.4.	CONTROLE BIOLÓGICO POR <i>M. anisopliae</i>	9
2.5.	TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT)	12
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1.	OBJETIVO GERAL	15
3.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO	15
4.	JUSTIFICATIVA	16
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1.	MICRO-ORGANISMOS, CÉLULAS E VETORES UTILIZADOS.....	17
5.2.	SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO.....	17
5.3.	MANUTENÇÃO E MANIPULAÇÃO DOS ORGANISMOS	21
5.4.	SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	21
5.5.	MATERIAIS DIVERSOS.....	21
5.6.	CONSTRUÇÃO DO CASSETTE DE DELEÇÃO DE ChiMaA4 PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE FUSÃO.....	22
5.7.	CLONAGEM DO CASSETTE DE DELEÇÃO Δ chimaA4 NO VETOR PPZP201BK	24
5.8.	CONFIRMAÇÕES POR CLIVAGENS E PCR	24
5.9.	TRANSFORMAÇÃO EM <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
5.10.	AGROTRANSFORMAÇÃO DE <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
5.11.	MANIPULAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) DOS TRANSFORMANTES	25
5.12.	SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES	25
6.	RESULTADOS	27
6.1.	CONSTRUÇÃO DO CASSETTE DE DELEÇÃO UTILIZANDO PCR DE FUSÃO	27
6.2.	CLONAGEM DO CASSETTE DE DELEÇÃO Δ chimaA4 NO VETOR pPZP201BK	28
6.3.	CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO	30
6.4.	AGROTRANSFORMAÇÃO DE <i>M. anisopliae</i> E SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES.....	31
7.	DISCUSSÃO	35
8.	CONCLUSÕES.....	37
9.	PERSPECTIVAS	38

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>M. anisopliae</i> linhagem E6.....	4
Figura 2. Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> (modificado de Schrank & Vainstein, 2010).	7
Figura 3. Estrutura química da quitina. O quadrado cinza indica uma subunidade de N-acetilglicosamina. (Modificado de Seidl, 2008).....	8
Figura 4. Desenho esquemático da transferência do T-DNA de <i>A. tumefaciens</i> para uma célula fúngica.....	13
Figura 5. Interação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e de <i>Metarhizium anisopliae</i> durante co-cultivo observada por microscopia eletrônica de varredura.	14
Figura 6. Esquema de construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chimaA4</i>	22
Figura 7. Amplificação das regiões do gene de interesse (1 ^o round).....	27
Figura 8. Amplificação do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chimaA4</i> (3 ^o round).	28
Figura 9. Representação esquemática da clonagem do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>bar</i> no vetor pCR2.1TOPO.	28
Figura 10. Confirmação da clonagem e orientação do <i>cassette</i> de deleção Δ chimaA4 no vetor pCR2.1TOPO.	29
Figura 11. Representação esquemática da construção do vetor pPZP:: Δ chimaA4::bar.....	29
Figura 12. Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP:: Δ chiMaA4::bar.	30
Figura 13. Confirmação da clonagem e orientação do <i>cassette</i> de deleção Δ chimaA4 no vetor pPZP201BK.	31
Figura 14. Isolamento dos possíveis transformantes. As placas foram cultivadas a 28°C por 10 dias.	32
Figura 15. Seleção dos transformantes com inserção do <i>cassette</i> de deleção por PCR negativo (primeira agrotransformação).....	33
Figura 16. Seleção dos transformantes com inserção do <i>cassette</i> de deleção por PCR negativo, utilizando molde diluído 1:50.....	33
Figura 17. Seleção dos transformantes com inserção do <i>cassette</i> de deleção por PCR negativo (segunda agrotransformação).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pragas da pecuária, da agricultura, vetores de doenças e causador de necroses suscetíveis à infecção por <i>M. anisopliae</i>	11
Tabela 2. Lista de <i>primers</i> utilizados para construção do <i>cassette</i>	23
Tabela 3. Lista de <i>primers</i> utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chimaA4</i> no genoma fúngico.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Por cento
Δ (gene)	Linhagem com deleção do gene subsequente
°C	Graus Célcus
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (Etiquetas de Sequência Expressas)
g	Gramma
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
LB	Meio Luria-Bertani
mg	Miligrama
Kb	quilobase
pb	pares de base
M	Molar
MCC	Meio de Cove completo
MES	Ácido N-morfolino-etanosulfônico
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase aberta de leitura)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)
μ g	Micrograma
μ g/mL	Micrograma por Mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
rpm	Rotação por minuto
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentososo que infecta uma ampla diversidade de hospedeiros artrópodes. A infecção ocorre pela penetração direta através da cutícula do hospedeiro que é composta por quitina. As quitinases são uma das famílias de hidrolases que estão envolvidas na dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros. Nos fungos estas enzimas estão envolvidas em morfogênese e nutrição. Análises de genomas mostram que entre 10 e 35 genes de quitinases estão presentes em fungos filamentosos. A análise *in silico* do genoma da linhagem E6 de *M. anisopliae* identificou 24 genes que provavelmente codificam para quitinases. As quitinases propostas foram categorizadas em quatro subgrupos de acordo com a sua proximidade filogenética e organização estrutural. Apesar do número de quitinases já isoladas ou descritas em fungos leveduriformes e filamentosos ser amplo, estudos envolvendo a descrição exata da função dessas quitinases ainda são escassos. Estudos anteriores do grupo mostraram que o gene que codifica ChiMaA4 apresenta níveis de transcritos similares em diferentes tipos celulares (conídio, hifa, apressório, blastosporo) e sob diferentes meios de cultivo: meio rico (MCc), GlcNAc (0,25%) ou quitina 1%. Nosso objetivo é a caracterização da função desta quitinase pela construção de mutantes funcionais para a quitinase ChiMaA4 e caracterização das alterações fenotípicas resultantes dessa deleção. Foi utilizada a metodologia de geração de mutantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A construção para a deleção da quitinase ChiMaA4 foi efetuada pela técnica de PCR de sobreposição (*overlapping*). O estudo realizado contribuirá para elucidar a função desta quitinase na fisiologia do *M. anisopliae*.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is a filamentous fungus that infects a wide variety of arthropod hosts. The infection occurs by means of the direct penetration through the cuticle of the host that is formed by chitin. The chitinases are one of the hydrolase family that are involved in the dissolution of the chitin exoskeleton of the hosts. In fungi, these enzymes are involved in morphogenesis and nutrition. Genome analysis shows that about 10 to 35 chitinase genes are present in filamentous fungi. *M. anisopliae* in silico genome analysis, identified 24 putative genes coding for chitinases. The proposed chitinases were categorized into 4 subgroups according to its filogenetic proximity and structural organization. Despite the wide number of chitinases already isolated or described in yeast and filamentous fungi, studies involving the precise function of these chitinases are still rare. Previous studies have shown that *M. anisopliae* E6 *chimaA4* gene has similar transcript levels in different cell types (e.g. conidia, hypha, apressorium, yeast-like blastospores) and under different substrates: rich medium (MCc), GlcNAc (0.25%) or chitin 1%. Our goal is to characterize the function of this chitinase by the construction of functional mutants for chitinase ChiMaA4 and analysis of the phenotypic changes resulting from this deletion. The mutants have been accomplished by a technique using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The construction for deletion of chitinase ChiMaA4 has been accomplished by the overlapping PCR technique. This study will help to better understand the function of this chitinase in the physiology of *M. anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosso entomopatogênico, alvo de diversos estudos no que concerne à compreensão das interações patógeno-hospedeiro devido ao seu elevado potencial como agente biocontrolador de diversos artrópodes (Dutra *et al.*, 2004; St Leger, 2008; Beys-Da-Silva *et al.*, 2013). Por este motivo, esse fungo vem sendo visto como alternativa aos produtos químicos no controle biológico de diversas pragas e insetos. Além de ser modelo de estudo para essas interações, *M. anisopliae* também é muito estudado a nível molecular, celular, genético, bioquímico e fisiológico (Arruda *et al.*, 2005; Boldo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Boldo *et al.*, 2010; Broetto *et al.*, 2010; Staats *et al.*, 2013).

Estudos sobre *M. anisopliae* têm como meta elucidar os mecanismos de infecção deste fungo nos seus hospedeiros, além de identificar especificidades de determinadas classes ou espécies de artrópodes (Freimoser, Hu & St Leger, 2005). Esse processo de infecção ocorre pela penetração direta do fungo na carapaça do hospedeiro, composta por quitina. A quitina é o principal componente estrutural da cutícula dos artrópodes, e fornece proteção contra agentes infectivos. Não presente apenas nos artrópodes, a quitina está também presente na parede celular dos próprios fungos. O mecanismo de infecção é propiciado pela combinação de vários fatores, e dentre eles, a secreção de enzimas hidrolíticas (Clarkson & Charnley, 1996), como as quitinases (Bogo *et al.*, 1998), as quais atuam na dissolução do exoesqueleto quitinoso do hospedeiro.

As quitinases são enzimas que vão agir na hidrólise completa da quitina em N-acetilglicosamina livre (Patil, Ghormade & Deshpande, 2000). Nos fungos, as quitinases estão envolvidas na modificação da quitina constituinte da parede celular durante o ciclo de vida, na liberação de esporos, na diferenciação e na morfogênese de hifas, além da disponibilização da quitina como nutriente (Gooday *et al.*, 2006). Entre 10 e 36 (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012) genes de quitinases estão presentes em fungos filamentosos de acordo com análises genômicas (Seidl, 2008). Para a linhagem E6 de *M. anisopliae*, uma análise *in silico* do genoma identificou 24 genes que provavelmente codificam para quitinases (Junges, 2010). De acordo com a proximidade filogenética e a organização estrutural, as quitinases sugeridas foram categorizadas em quatro subgrupos (Junges, 2010). Mutantes para dois genes em

M. anisopliae foram feitos com o propósito de melhor entender a atividade das quitinases. Boldo *et al.*, em 2009, obtiveram resultados de maior virulência de linhagens com superexpressão do gene *chi2*, em comparação com o tipo selvagem desta linhagem, frente ao hospedeiro *Dysdercus peruvianus*. Ainda no mesmo estudo, foi identificada a virulência reduzida de mutantes nulos para o gene que codifica a quitinase CHI2, fato que evidencia a influência desta proteína no processo de infecção. Além desta, nos bioensaios contra *D. peruvianus* com a deleção da endo-exo-quitinase, codificada pelo gene *chi3*, foi verificada uma menor virulência (Staats, 2007a).

Em oposição, a superexpressão de *chi3* foi letal para o fungo. Os mutantes nulos para este gene não apresentaram nenhuma alteração morfológica observável tampouco uma diferença substancial na atividade de secreção entre a linhagem selvagem e a mutante. Porém, os mutantes $\Delta chi3$ desenvolveram uma redução na atividade das endo e exoquitinases após serem incubados a uma temperatura de 42°C, indicando que a quitinase CHIT30 está envolvida no processo de infecção (Staats *et al.*, 2013). Mesmo com a ampla quantidade de quitinases já isoladas ou descritas em fungos leveduriformes e filamentosos, pesquisas focadas na descrição exata da função dessas quitinases ainda são escassas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Metarhizium anisopliae* COMO MODELO DE ESTUDO

Metarhizium anisopliae foi inicialmente identificado como *Entomophthora anisopliae* por Metchnikoff em 1879, isolado a partir de larvas de besouro-do-grão-do-trigo (*Anisopliae austriaca*) infectadas (Driver *et al.*, 2000), porém em 1883, Sorokin o descreveu com um novo gênero chamado *Metarhizium* que possuía esporos do mesmo tamanho daqueles descritos em trabalhos anteriores. A classificação dada pelo banco de dados de nomenclatura *Index Fungorum Partnership* (<http://www.speciesfungorum.org/>) para *M. anisopliae* é como pertencente ao filo *Ascomyceto*, classe *Sordariomycete*, ordem *Hipocreales* e família *Clavicipitacea*.

M. anisopliae é um fungo filamentosos capaz de infectar mais de trezentas espécies de hospedeiros artrópodes, e é um dos entomopatógenos mais comumente isolados a partir de insetos (Charnley, 1991). Por estas e outras características este fungo é considerado um modelo para o estudo das interações existentes entre entomopatógenos e seus hospedeiros, além de ser reconhecidamente um agente de controle biológico de pragas.

M. anisopliae está presente mundialmente, com representantes em todos os continentes com exceção da Antártida (Roberts & St Leger, 2004), e pode ser encontrado em solos, rizosfera de plantas (Hu & St Leger, 2002) e cadáveres de artrópodes, como saprófitas ou parasitas (Wang, Hu & St Leger, 2005; Schrank & Vainstein, 2010). É responsável também pela *green muscardine*, uma infecção fúngica com origem na incrustação dos cadáveres de insetos com conídios verdes (Roberts & St Leger, 2004) e por esta capacidade, este entomopatógeno é muito estudado no que concerne a sua interação com artrópodes suscetíveis. Várias proteínas já são conhecidas, boa parte destas com participação caracterizada no processo da patogenicidade: quitinases (Bogo *et al.*, 1998), proteases (St Leger, Charnley & Cooper, 1987), lipases (Silva, 2005), destruxinas (Kershaw *et al.*, 1999), trealases (Xia *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006), fosfatase ácida (Xia *et al.*, 2000), entre outras.

M. anisopliae é tido morfológicamente como um fungo filamentoso de micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas, geralmente unicelulares, com coloração esverdeada quando maduros (Bischoff, Rehner & Humber, 2009)(Figura 1).

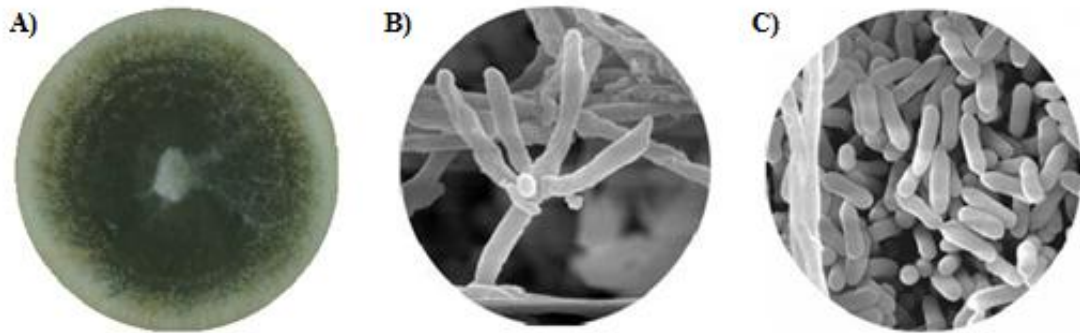


Figura 1. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae* linhagem E6. Colônia após 21 dias de cultivo em meio de Cove completo (MCc) a 28°C. A) Micélio hialino de coloração branca na extremidade da colônia de onde emergem os conidióforos. B) Conidióforos. C) Esporos cilíndricos. As micrografias de varredura (MEV) são de autoria de (Arruda *et al.*, 2005)

Por seu elevado potencial de infectar artrópodes, *M. anisopliae* tem sido extensivamente pesquisado. Existe atualmente uma diversidade de informações e ferramentas disponíveis em bancos de dados, como por exemplo, a caracterização de promotores para a expressão de genes de interesse (Nakazato *et al.*, 2006), os bancos de dados de bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (ESTs) (Freimoser *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Wang, Hu & St Leger, 2005; Peng *et al.*, 2009; Zhang & Xia, 2009) e o estudo funcional de genes através da agrotransformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Staats *et al.*, 2007b; Boldo *et al.*, 2009). O avanço do conhecimento sobre a patogenia causada por *M. anisopliae* é facilitado pela disponibilidade de todas estas ferramentas. Além disto, estas ferramentas são essenciais para a produção de novas linhagens, através da superexpressão de genes específicos, nas quais a virulência do entomopatógeno seja aumentada, e com isto realizar um biocontrole mais eficiente (Screen, Hu & St Leger, 2001).

2.2. PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Metarhizium anisopliae*

A carapaça (ou cutícula) é o principal mecanismo de defesa dos insetos e artrópodes em geral contra tentativas de ataque de patógenos. Apenas uma parte ínfima de toda a diversidade de micro-organismos presentes no ambiente consegue infectá-los devido a esta proteção. O meio utilizado por alguns micro-organismos, principalmente bactérias, para conseguir invadir alguns insetos é através da ingestão, adentrando no organismo pela mesma via do alimento (Crickmore, 2006). *M. anisopliae*, em oposição a estes outros entomopatógenos como vírus e bactérias, não necessita ser ingerido para infectar seus hospedeiros, pois consegue penetrar ativamente no exoesqueleto ou na cutícula do inseto por meio de estruturas infectivas como o apressório (Clarkson & Charnley, 1996).

A cutícula é composta basicamente por duas camadas: a epicutícula, mais externa e a procutícula. Estas são formadas essencialmente por fibrilas de quitina embebidas em uma matriz protéica juntamente com lipídios e quinonas. Aproximadamente 70% da cutícula é composta por proteína (Clarkson & Charnley, 1996). *Metarhizium*, no momento de ataque ao inseto-hospedeiro, enfrenta não apenas obstáculos físicos, como por exemplo, o exoesqueleto rígido e o intestino médio revestido de membrana peritrófica, mas também respostas coordenadas de hemócitos e a síntese de peptídeos antimicrobianos (Gillespie, Bateman & Charnley, 1998). A produção assexuada e subsequente dispersão no ambiente de conídios é o início do mecanismo de infecção do fungo.

Ao entrar em contato com o hospedeiro, os conídios se fixam na cutícula através de hidrofobinas, que são proteínas apolares responsáveis pela interação com a camada lipídica presente na superfície, facilitando a adesão (St Leger, Staples & Roberts, 1992; Fang, Pei & Bidochka, 2007). Após a adesão, o esporo germina e o tubo germinativo, na sua porção apical, se diferencia por dilatação formando uma estrutura utilizada para penetração chamada de apressório (Arruda *et al.*, 2005). Este apresenta grande concentração interna de açúcares que é responsável pela geração de pressão osmótica, necessária para penetração (Wang, Hu & St Leger, 2005). O apressório realiza pressão mecânica no exoesqueleto e juntamente com a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases (St Leger,

Charnley & Cooper, 1987) e quitinases (Bogo *et al.*, 1998) ocorre a penetração do fungo no hospedeiro.

No momento em que as hifas de *M. anisopliae* alcançam a hemolinfa (que consiste em um fluido circulatório que banha os órgãos do inseto), estas hifas se diferenciam em estruturas unicelulares leveduriformes chamadas blastosporos, o que permite auxiliar na disseminação e colonização do fungo na hemocele, na melhora da captação de nutrientes devido ao aumento da área superficial, e na subversão do sistema imune celular do hospedeiro. Neste estágio de disseminação, o fungo consome a totalidade dos nutrientes da hemolinfa, além de acontecer a liberação de metabólitos secundários como as destruxinas (toxinas fúngicas), as quais afetam a resposta imune humoral (Pal, St Leger & Wu, 2007), contribuindo, deste modo, na colonização plena do hospedeiro após a penetração (St Leger, 1991).

Nos momentos posteriores à morte do inseto, as hifas emergem gerando um micélio o qual recobre a superfície do tegumento, produzindo esporos que novamente poderão ser lançados no ambiente e infectar outros hospedeiros (Shah & Pell, 2003) (Figura 2).

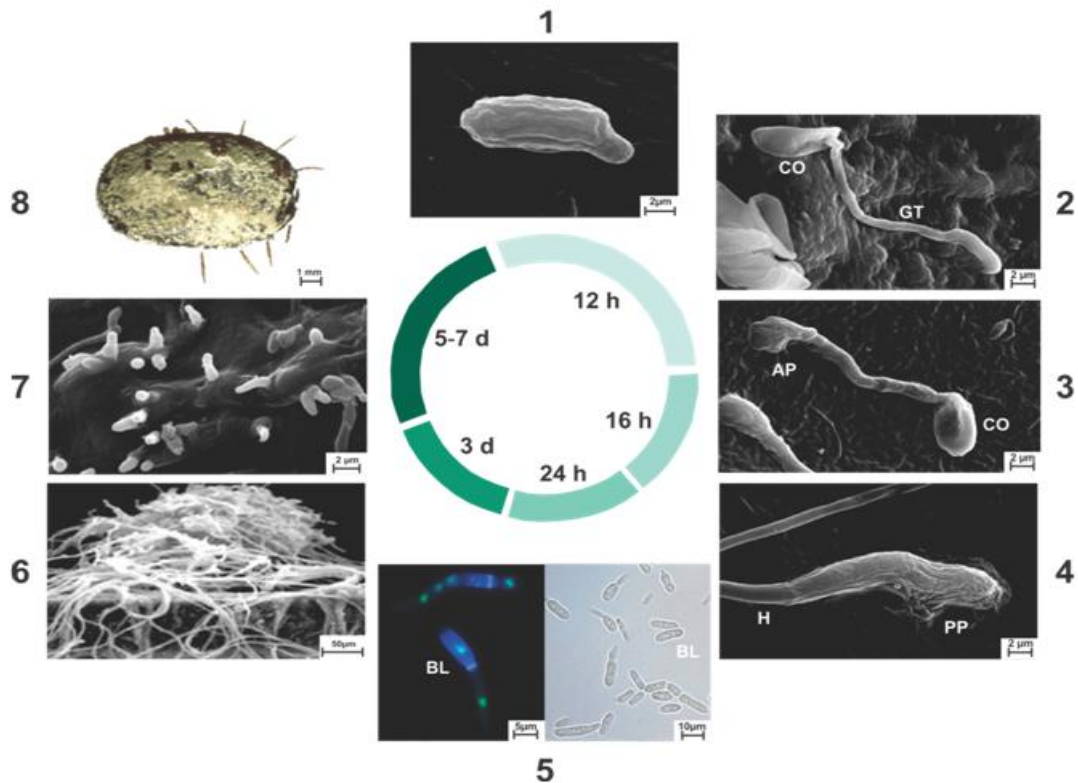


Figura 2. Ciclo de infecção de *M. anisopliae* sobre *Rhipicephalus microplus* (modificado de Schrank & Vainstein, 2010). (1) MEV da adesão do conídio à cutícula do hospedeiro; (2) MEV da germinação do conídio; (3) MEV da diferenciação do tubo germinativo em apressório; (4) MEV da penetração na cutícula; (5) microscopia ótica da diferenciação da hifa em blastosporos; (6) MEV da colonização do hospedeiro; (7) MEV da extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e (8) fotografia dos conidióforos e da produção de conídios no cadáver do carrapato. CO-conídio; GT-tubo germinativo; AP-apressório; H-hifa; PP-grampo de penetração; BL-blastosporo.

2.3. QUITINASES EM FUNGOS FILAMENTOSOS

A quitina ($C_8H_{13}O_5N$)_n é um homopolímero linear insolúvel composto de subunidades do amino açúcar acetilado N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações β-1,4 (Figura 3) e é abundantemente distribuída na natureza.

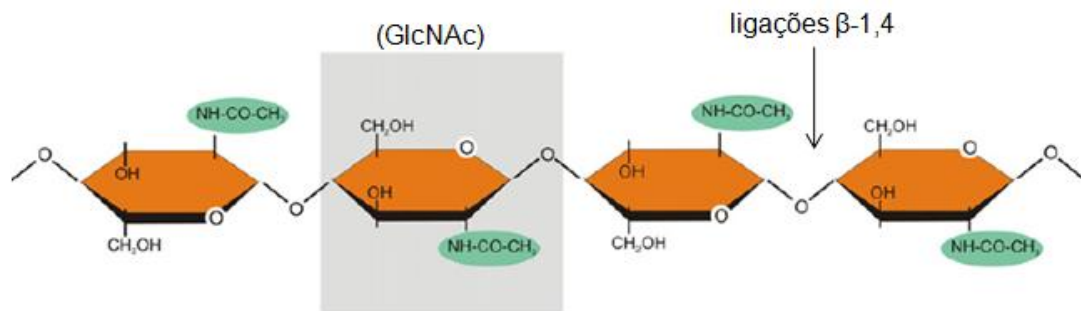


Figura 3. Estrutura química da quitina. O quadrado cinza indica uma subunidade de N-acetilglicosamina. (Modificado de Seidl, 2008)

Um dos principais componentes da cutícula dos artrópodes é a quitina. Esta é fundamental na proteção contra infecções de vírus e bactérias, servindo como barreira. A quitina proporciona rigidez às estruturas que integra, e é encontrada desde fungos até moluscos e artrópodes em geral (Bernard & Latge, 2001).

Em torno de 90% da parede celular em fungos filamentosos é composta de quitina e outros polissacarídeos, o que assegura proteção contra fatores ambientais, dissecação e pressão osmótica (Latge, 2007).

Depois da celulose, acredita-se ser o segundo mais abundante e renovável polímero (Duo-Chuan, 2006), podendo ser obtida também de derivados marinhos, os quais podem ser processados e aplicados em produtos comerciais (Adams, 2004; Duo-Chuan, 2006).

A hidrólise completa deste polímero para a liberação de monômeros de N-acetilglicosamina é efetuada pela ação sinérgica e consecutiva de um sistema quitinolítico (Patil, Ghormade & Deshpande, 2000).

As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas que hidrolisam as ligações β -1,4 presentes no polímero de quitina, produzindo oligômeros e monômeros de (GlcNAc) que posteriormente podem ser reutilizados na síntese de quitina ou como fonte nutricional pelo organismo. São diversas as espécies nas quais estas enzimas estão presentes (Duo-Chuan, 2006), tendo funções distintas: nas plantas, fazem parte da defesa contra patógenos fúngicos (Iseli *et al.*, 1996); em artrópodes estão relacionadas com a morfogênese, por meio da degradação da cutícula velha para o crescimento (Merzendorfer & Zimoch, 2003); nos vírus estão envolvidas na

patogênese (Patil, Ghormade & Deshpande, 2000); nas bactérias, são importantes para o parasitismo e digestão da quitina como fonte nutricional (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Patil, Ghormade & Deshpande, 2000); e nos vertebrados, participam nos mecanismos de resistência contra patógenos (Patil, Ghormade & Deshpande, 2000). Em fungos filamentosos, as quitinases apresentam diversas funções, entre as quais: (i) nutrição, por meio da degradação da quitina exógena (cutícula de artrópodes) e da utilização de produtos de degradação como fonte de nutrientes; (ii) morfogênese, com o remodelamento da parede celular, nas fases de crescimento, ramificação, fusão e autólise; e (iii) na competição e defesa de habitat, contra outros fungos e artrópodes (Adams, 2004). Ainda não são muitos os estudos que trazem descrições precisas das funções dessas quitinases, mesmo apesar do elevado número de quitinases já isoladas ou descritas em fungos leveduriformes e filamentosos (Duo-Chuan, 2006).

2.4. CONTROLE BIOLÓGICO POR *M. anisopliae*

Um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre organismos de qualquer espécie (seja animal, vegetal ou microbiana), é de que sempre existem inimigos naturais, sejam predadores, parasitas ou patógenos. O controle biológico tem origem neste fato, e pode ser definido como qualquer atividade de manipulação destes inimigos, e/ou também a manipulação de genes ou produtos gênicos, com vistas e objetivo claro de reduzir ou suprimir uma população animal ou vegetal que represente uma praga (Barbosa, 2013).

Em relação ao controle químico, o controle biológico se apresenta como uma opção vantajosa, especialmente em relação a impacto ambiental, custo, especificidade e desenvolvimento de resistência, não afetando populações de outros artrópodes, como inimigos naturais de pragas ou que são ecologicamente importantes (He & Xia, 2009).

Já em 1879, conforme indicado em (Lord, 2005), Metschnikoff, deparando-se com a grande necessidade de reduzir a enorme perda econômica causada pela infestação das plantações de cereais pelo besouro *A. austriaca*, propôs a produção, dispersão e aplicação de conídios de *M. anisopliae* como medida de controle biológico. Esse fungo tem sido amplamente pesquisado,

demonstrando ser um organismo com grande potencial para o biocontrole. Devido a sua versatilidade, pode infectar mais de trezentas espécies de artrópodes (Frazzon *et al.*, 2000). Pode parasitar artrópodes pragas da pecuária, como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon *et al.*, 2000) e da agricultura, como o gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Tounou *et al.*, 2008). Atinge desde insetos até ácaros (Roberts & St Leger, 2004).

Além disto, *M. anisopliae* tem o potencial para controlar vetores de doenças humanas, como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (Novotny *et al.*, 2002; Scholte, Takken & Knols, 2007; Sousa *et al.*, 2013), da Malária *Anopheles gambiae* (Scholte, Knols & Takken, 2006), da doença de Chagas *Triatoma infestans* (Luz *et al.*, 1998) e a mosca tsé-tsé *Glossina* sp. (Kaaya & Munyinyi, 1995), além de agir como biocontrole da aranha marrom (*Loxosceles* sp) que através de sua mordida causa um perfil clínico severo em humanos associado a lesões dermonecroticas e manifestações sistêmicas que podem ser intensas e fatal (Beys-Da-Silva *et al.*, 2013).

Na Tabela 1, podem ser observadas algumas espécies de hospedeiros suscetíveis à infecção por *M. anisopliae*.

Tabela 1. Pragas da pecuária, da agricultura, vetores de doenças e causador de necroses suscetíveis à infecção por *M. anisopliae*.

Pragas	Nome científico	Nome popular	Referência
Pragas da Pecuária	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Carrapato bovino	(Frazzon <i>et al.</i> , 2000; Polar <i>et al.</i> , 2005)
Pragas da Agricultura	<i>Diabrotica uncimpunctata</i>	Verme da raiz do milho	(Krueger, 2013)
Pragas da Agricultura	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Gorgulho da Videira	(Bruck, 2005)
Pragas da Agricultura	<i>Hoplia philantjus</i>	Besouro	(Ansari <i>et al.</i> , 2004)
Pragas da Agricultura	<i>Musca domestica</i>	Mosca	(Barson, Renn & Bywater, 1994)
Pragas da Agricultura	<i>Ceratitidis capitata</i>	Mosca das frutas	(Mochi <i>et al.</i> , 2006)
Pragas da Agricultura	<i>Locusta migratoria</i>	Gafanhoto	(Lomer <i>et al.</i> , 2001)
Pragas da Agricultura	<i>Schistocerca gregaria</i>	Gafanhoto do deserto	(Nowierski <i>et al.</i> , 1996)
Pragas da Agricultura	<i>Dysdercus peruvianus</i>	Percevejo manchador do algodão	(Lubeck <i>et al.</i> , 2008)
Pragas da Agricultura	<i>Mahanarva posticata</i> , <i>M. frimbriolata</i>	Cigarrinha da cana-de-açúcar	(Bechara <i>et al.</i> , 2011)
Pragas da Agricultura	<i>Manduca sexta</i>	Lagarta da folha do tabaco	(Xia, Clarkson & Charnley, 2002)
Vetores de doenças	<i>Anopheles gambiae</i>	Vetor da malária	(Scholte <i>et al.</i> , 2003)
Vetores de doenças	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Vetor da filariose	
Vetores de doenças	<i>Triatoma infestans</i>	Vetor da doença de chagas	(Scholte <i>et al.</i> , 2003)
Vetores de doenças	<i>Glossina</i> spp.	Vetor da doença do sono	(Kaaya & Munyinyi, 1995)
Causador de necroses	<i>Loxosceles</i> spp.	Aranha marrom	(Beys-Da-Silva <i>et al.</i> , 2013)

A necessidade de condições ambientais (temperatura, umidade) favoráveis é uma das desvantagens encontradas na utilização dos biocontroladores, os quais podem ser afetados sem estas condições. Em relação ao controle químico, observa-se ainda que o período de tempo necessário entre a aplicação do biocontrole e a morte dos hospedeiros pode ser muito superior. Apesar destas

desvantagens, muita pesquisa e estudo têm sido realizados para aprimorar técnicas e aumentar as possibilidades de tirar o máximo de proveito do grande potencial biocontrolador de *M. anisopliae*. Exemplos disso são a produção de esporos em massa e o desenvolvimento de formulações eficazes, a otimização da aplicação do inóculo, a dispersão dos conídios e a sua viabilidade após a aplicação no ambiente (persistência), a virulência da linhagem utilizada frente ao hospedeiro alvo e principalmente o tempo, considerado longo, que *M. anisopliae* leva para matar seu hospedeiro (St Leger *et al.*, 1996).

2.5. TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria fitopatogênica responsável pelo tumor de galha em plantas. Esta bactéria tem grande utilidade na manipulação genética pela sua capacidade de transferir parte de seu material genético para outras células. A bactéria tem também como característica marcante o fato de ter uma vasta gama de hospedeiros, os quais incluem numerosas espécies de angiospermas dicotiledôneas e monocotiledôneas, gimnospermas, fungos (incluindo leveduras, ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos e oomicetos) e até mesmo células humanas (Gelvin, 2003). Todos estes organismos são passíveis de receberem transferência de DNA do gênero *Agrobacterium*.

Em fungos filamentosos, a agrotransformação 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 sequência de um gene conhecido ou (iii) criação de uma biblioteca de inserção, com consequente análise de fenótipos e posterior isolamento das sequências flanqueadoras do T-DNA inserido no genoma do fungo (Weld *et al.*, 2006).

O mecanismo de transferência do T-DNA de *A. tumefaciens* está representado na **Figura 4**. As linhagens para agrotransformação carregam o vetor binário, o qual contém o DNA a ser transferido (T-DNA) flanqueado por sequências de 24 pb nomeadas borda esquerda e borda direita, e o plasmídeo TI, que apresenta os genes de virulência (*vir*) que codificam as proteínas dos elementos de transferência do material contido entre as bordas do vetor binário. São utilizados

compostos fenólicos, como a acetoseringona, para induzir as proteínas VirA e VirG, as quais se autofosforilam. VirG ativada tem propriedades de ligação ao DNA servindo como ativador da sua própria transcrição e da transcrição de outros genes *vir*. Os produtos gênicos dos operons *virC* e *virD* (VirD2, VirD1, VirC1, entre outros) são responsáveis pela geração da fita simples do T-DNA, e as proteínas VirB1-11 e VirD4 pela sua transferência por meio da formação de um poro e de uma estrutura de superfície chamada de pilus-T.

Além do complexo T-DNA/VirD2, as proteínas VirE2, VirE3 e VirF são também exportadas via sistema de secreção e protegem o T-DNA contra nucleases do hospedeiro. A fita-T é levada ao núcleo da outra célula, na fase de co-cultivo, por um sinal de localização nuclear o qual está presente na metade C-terminal de VirD2. Quando dentro do núcleo, o T-DNA se integra de maneira estável no genoma (Michielse *et al.*, 2005) (Figura 5).

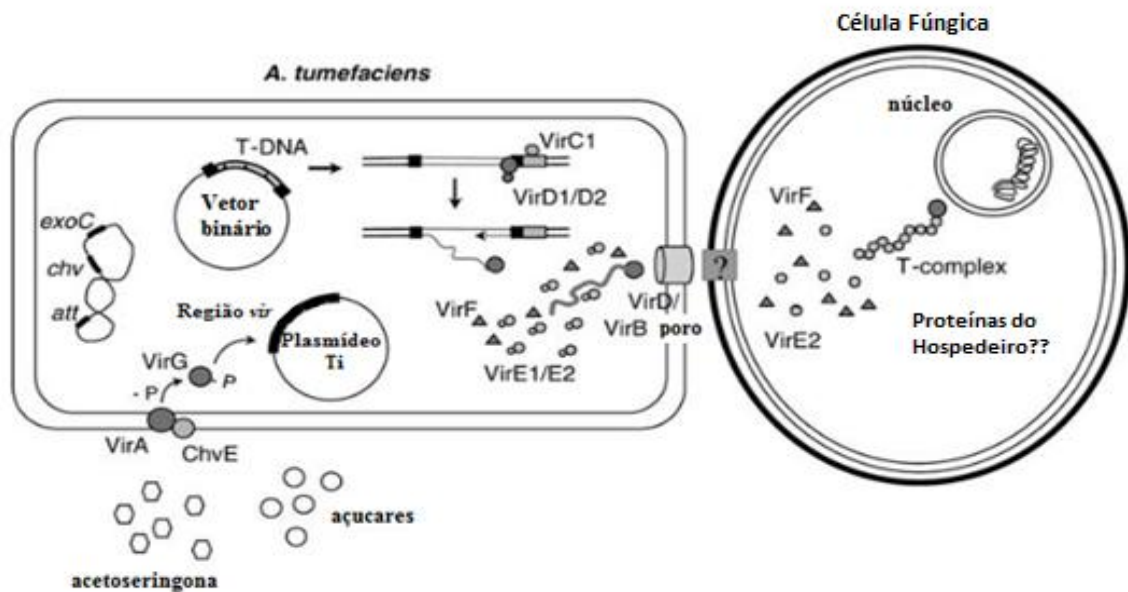


Figura 4. Desenho esquemático da transferência do T-DNA de *A. tumefaciens* para uma célula fúngica. (Modificado de Michielse *et al.*, 2005)

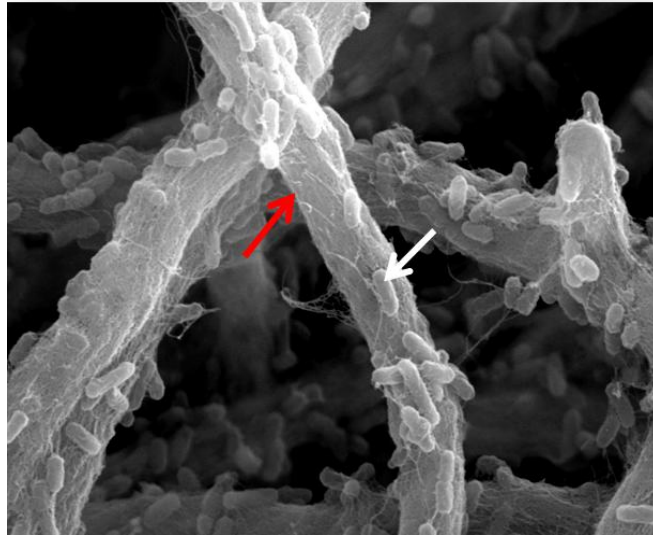


Figura 5. Interação de células de *Agrobacterium tumefaciens* e de *Metarhizium anisopliae* durante co-cultivo observada por microscopia eletrônica de varredura. A seta vermelha indica o crescimento da hifa de *M. anisopliae*. A seta branca indica *A. tumefaciens* sobre a hifa do fungo. (A imagem de MEV é de autoria de Staats *et al.*, 2007b).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a função da quitinase ChiMaA4 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* pela construção de mutantes nulos e sua posterior caracterização das alterações fenotípicas resultantes dessa deleção, utilizando como metodologia a geração de mutantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- i) Construir mutantes nulos para a quitinase ChiMaA4 selecionada, envolvendo a utilização de técnicas de clonagem molecular para a construção de vetores contendo o gene alvo truncado e posterior transformação por *Agrobacterium tumefaciens* e seleção dos mutantes em meio seletivo contendo a marca de resistência inserida no *cassette* de deleção.

4. JUSTIFICATIVA

Para determinar quais quitinases de *Metarhizium anisopliae* atuam no processo de remodelamento, nutrição, autólise e quais atuam no processo de infecção no hospedeiro é importante determinar a função das diferentes quitinases produzidas por estes fungos. Estudos anteriores do grupo mostraram que o gene *ChimaA4* de *M. anisopliae* linhagem E6 apresenta níveis de transcritos similares em diferentes tipos celulares (conídio, hifa, apressório, blastosporo) e sob diferentes meios de cultivo: meio rico (MCc), GlcNAc (0,25%) ou quitina 1% (Junges, 2010). O estudo realizado contribuirá para elucidar a função desta quitinase na fisiologia do fungo *M. anisopliae*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MICRO-ORGANISMOS, CÉLULAS E VETORES UTILIZADOS

A linhagem E6 do fungo filamentososo *M. anisopliae* foi utilizada como linhagem selvagem (WT) neste trabalho. Foi isolada a partir de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidea) no estado do Espírito Santo (cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo – ESALQ/USP).

A linhagem XL1-Blue (*Stratagene*) de *E. coli* foi utilizada para as manipulações de DNA de acordo com procedimentos padrão (Sambrook & Russell, 2001). A linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi utilizada para os eventos de agrotransformação, juntamente com o seu vetor binário pPZP201BK, os quais foram cedidos pelo Prof. Giancarlo Pasquali (Centro de Biotecnologia-UFRGS). Também foi utilizado para etapas intermediárias o vetor pCR2.1TOPO (*Invitrogen*).

5.2. SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

5.2.1. Meio de Cove completo – MCc

Nitrato de sódio (NaNO ₃).....	0,6 % (m/V)
Glicose –.....	1 % (m/V)
Peptona –.....	0,2 % (m/V)
Extrato de Levedura –.....	0,05 % (m/V)
Caseína Hidrolisada ou Casaminoácidos –.....	0,15 % (m/V)

Dissolvido em água destilada e ajustado o pH para 6,0. Autoclavado e adicionado assepticamente 2 % de Solução de Sais (item 5.2.2) e 0,04 % de Solução de Elementos Traços (item 5.2.3) no momento do uso. Para meio sólido, foi adicionado antes de autoclavar 2 % de ágar (m/V).

5.2.2. Solução de Sais

Cloreto de Potássio (KCl) –.....	2,6 % (m/V)
Sulfato de Magnésio Heptaidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)-	2,6 % (m/V)
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) –.....	7,6 % (m/V)

Dissolvido em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

5.2.3. Solução de Elementos Traços

Borato de Sódio heptaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) –.....	0,004 % (m/V)
Sulfato de Cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) –.....	0,04 % (m/V)
Sulfato de Ferro (FeSO_4) –.....	0,0001 % (m/V)
Sulfato de Manganês diidratado (MnSO_4) –.....	0,08 % (m/V)
Molibdato de Sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) –.....	0,08 % (m/V)
Sulfato de Zinco heptaidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) –.....	0,08 % (m/V)

Foi adicionado HCl concentrado até a completa dissolução dos sais. Esterilizado por autoclavagem.

5.2.4. Meio SOC

Triptona -.....	1% (m/V)
Extrato de Levedura -	5 % (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl) -.....	1% (m/V)
Glicose -.....	20mM

Foi dissolvido em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

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

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

Foi dissolvido em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

5.2.6. Meio de Luria-Bertani – LB

Triptona –.....	1 % (m/V)
Extrato de Levedura –.....	0,5 % (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl) –.....	1 % (m/V)

Dissolvido em água destilada e ajustado o pH para 7,0. Esterilizado por autoclavagem. Para meio sólido, foi adicionado antes de autoclavar 2 % de ágar (m/V).

5.2.7. Solução de Glicerol 10 % (V/V)

Glicerol –.....	10 % (V/V)
-----------------	------------

Foi dissolvido em água destilada e esterilizado por autoclavagem.

5.2.8. Tampão Tris-EDTA – TE

Tris.Cl pH 8,0 –.....	10mM
EDTA –.....	1mM

Diluído em água Milli-Q e autoclavado.

5.2.9. Meio de Indução – IM

Sais MM (item 5.2.10) –.....	1x
Glicose –.....	10mM
Glicerol –.....	0,5 % (V/V)
Sulfato de Amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄) –.....	5mg.mL ⁻¹

Dissolvido em água destilada e esterilizado por autoclavagem. No momento do uso, foi adicionado assepticamente MES 40mM (item 5.2.11).

5.2.10. Sais MM 2,5x

Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) –.....	0,36 % (m/V)
Fosfato de Potássio Dibásico (K ₂ HPO ₄) –.....	0,51 % (m/V)
Cloreto de Sódio (NaCl) –.....	0,37 % (m/V)
Sulfato de Magnésio Heptaidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O) –.....	0,12 % (m/V)
Cloreto de Cálcio Diidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O) –.....	0,016 % (m/V)
Sulfato de Ferro Heptaidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O) –.....	0,00062 % (m/V)

Foi adicionado os sais em água destilada e HCl até a completa dissolução. Esterilizado por autoclavagem.

5.2.11. Solução MES 1M

Foi dissolvido 19,52g de MES em 80mL de água destilada, ajustado o pH para 5,3, utilizando KOH 5M. Completou-se o volume para 100 mL e esterilizou-se por filtração em filtros, contendo poros de 45 µm. Armazenado a -20 °C.

5.2.12. Solução de Acetoseríngona 10 mM – AS

Adicionado 0,0196 g de Acetoseríngona em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Armazenado a -20°C.

5.2.13. Meio top Ágar MM

Glicose –.....	1 % (m/V)
Nitrato de Sódio (NaNO ₃) –.....	0,6 % (m/V)
Ágar –.....	0,7 % (m/V)

Esterilizado por autoclavagem. Após, foi adicionado assepticamente solução de sais 2 % (item 5.2.2), elementos traços 0,04 % (item 5.2.3), cefotaxima 200 µg.mL⁻¹ (item 5.2.14) e glifosinato de amônio 100 µg.mL⁻¹ (item 5.2.15).

5.2.14. Solução de Cefotaxima 100 mg.mL⁻¹

Injetou-se 10 mL de água estéril em um frasco, contendo 1g de Mefoxin® (Merk). Misturou-se bem até a completa dissolução do antibiótico e foi armazenado a 4°C.

5.2.15. Solução de Glifosinato de Amônio 40 mg.mL⁻¹

A partir da formulação comercial Finale ® (Bayer) foi feito um tratamento com n-butanol para a remoção de compostos não desejados, como corantes e detergentes. Misturou-se o composto a n-butanol em uma proporção de 1:1. Após decantação em funil de separação, a fase inferior foi recuperada e a superior descartada. Repetiu-se o processo de tratamento com n-butanol, recuperou-se a fase inferior e foi armazenado a 4°C.

5.2.16. Solução de Glicose 1 % (m/V)

Glicose –.....	1% (m/V)
----------------	----------

Esterilizado por passagem em filtros de 0,22 µm. Armazenado em temperatura ambiente.

5.2.17. Meio Mínimo – MM

Nitrato de Sódio (NaNO ₃) –.....	0,6 % (m/V)
Glicose –.....	1 % (m/V)

Foi dissolvido os reagentes em água destilada e esterilizado por autoclavagem. Adicionou-se assepticamente solução de sais 2 % (item 5.2.2) elementos traços 0,04 % (item 5.2.3). Para meio sólido, foi adicionado antes de autoclavar 2 % de ágar (m/V).

5.3. MANUTENÇÃO E MANIPULAÇÃO DOS ORGANISMOS

Manutenção da linhagem E6 de *M. anisopliae*

A linhagem E6 foi inoculada em meio MCc (item 5.2.1) sólido adicionado de 2% de soluções de sais (item 5.2.2) e 0,04% de elementos traços (item 5.2.3) a 28°C até esporulação (em torno de 7 a 10 dias).

Manipulação de *E.coli*

Inóculos de células de *E.coli* foram realizados em meio de LB (item 5.2.6) e em meio SOC (item 5.2.4) após eletroporação. Aos meios sólidos, foram adicionados 1,5% de ágar. Todos os meios foram mantidos a 37°C.

5.4. SUSPENSÃO DE ESPOROS

Foram vertidos aproximadamente 3 mL da solução de Tween 80 (item 5.2.5) em placas de Petri, contendo a linhagem E6 de *M. anisopliae* esporulada. Com a alça de Drigalsky, friccionaram-se levemente as colônias com o intuito de remover os conídios e dispersá-los na solução adicionada. Com uma pipeta Pasteur, a suspensão foi transferida a um *falcon* estéril. O tubo, foi centrifugado a 5.000 rpm por 7 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e água Milli-Q estéril foi adicionada para lavar os esporos. A suspensão foi centrifugada novamente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2mL de água Milli-Q estéril. Os esporos foram ressuspensos com o auxílio do *Vortex*. Para a contagem dos esporos e determinação da concentração da suspensão, foi utilizada a câmara de Neubauer.

5.5. MATERIAIS DIVERSOS

Todas as soluções foram preparadas de acordo com Sambrook & Russell (2001), utilizando água destilada ou Milli-Q autoclavadas. Os antibióticos Ampicilina e Canamicina foram utilizados em concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. As enzimas: de restrição (*Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI e *Sac*I) e a Taq DNA polimerase, foram obtidas a partir da *Fermentas*, *New England Biolabs* e *Invitrogen*. Para purificação dos fragmentos de DNA foi utilizado o *Kit GFX PCR DNA and Gel band purification* (*GE Healthcare*).

5.6. CONSTRUÇÃO DO CASSETTE DE DELEÇÃO DE ChiMaA4 PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE FUSÃO

Para investigar a função da quitinase ChiMaA4 do fungo *M. anisopliae*, foi construído um *cassette* de deleção pela estratégia de PCR de sobreposição (*overlapping*) (Yu *et al.*, 2004). Esta técnica permite a fusão de fragmentos de DNA através de pequenas sequências homólogas sobrepostas com as extremidades da marca de seleção escolhida. Três *amplicons* obtidos no primeiro *round* (Figura 6) com *primers* específicos (Tabela 2) foram utilizados no segundo *round* para a fusão: um fragmento de 1.000 pb correspondente a região 5' flanqueadora à região codificante do gene *chimaA4*, um fragmento de 1.000 pb correspondente à região 3' flanqueadora da região codificante do mesmo gene e um fragmento de 1.880 pb correspondente a marca de seleção (gene *bar*) a qual confere resistência ao glifosinato de amônio (Figura 7). O produto de amplificação do segundo *round* foi utilizado como molde para a amplificação de todo o *cassette* de nocaute com os *primers* *Nested* no terceiro *round* (Tabela 2) (Figura 8).

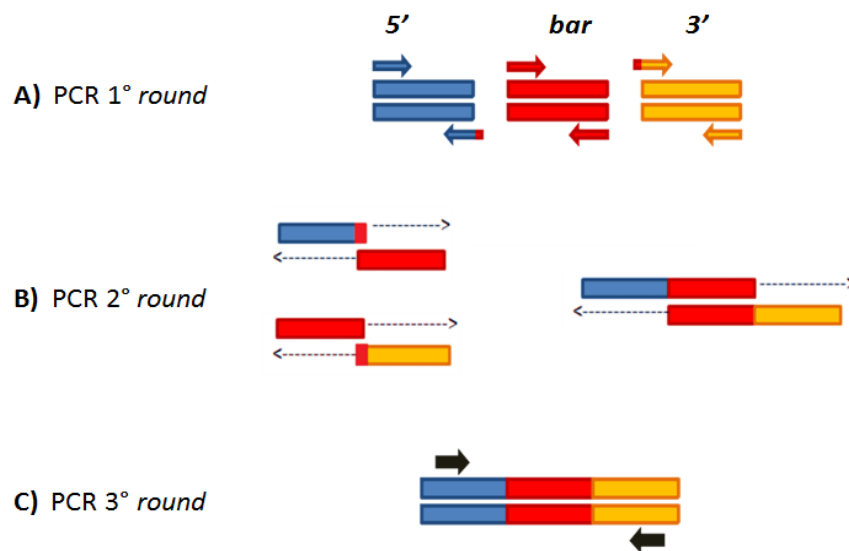


Figura 6. Esquema de construção do *cassette* de deleção do gene *chimaA4*. Através da reação de fusão, os fragmentos de DNA da região 5', 3' e da marca de resistência *bar* foram fusionados. (A) PCR 1º *round*: amplificação das regiões 5' e 3' do gene de interesse e da marca de resistência *bar*. (B) PCR 2º *round*: fusão dos três fragmentos. (C) PCR 3º *round*: amplificação da construção fusionada, utilizando os *primers* *Nested*. (Modificado de Yu *et al.*, 2004)

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados para construção do *cassette*

Primer	Sequência (5'-3')	Utilização
A4_5FOR	TCAGTGGGTCGTCCATTCTA	Amplificação da região 5' flaqueadora à região codificante do gene <i>chimaA4</i>
A4_5REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCCTG TACAGATTGCTCGGCGCGGAAA	Amplificação da região 5' flaqueadora à região codificante do gene <i>chimaA4</i>
A4_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTA	Amplificação da região 3' flaqueadora à região codificante do gene <i>chimaA4</i>
A4_3REV	CTCGACAGCGAAGTAACAAGTAATC TCAATATCGCCCGGCTTT	Amplificação da região 3' flaqueadora à região codificante do gene <i>chimaA4</i>
BAR_F	CCATGGCCATGAGCCCAGAACGAC	Amplificação da porção codificadora do gene <i>bar</i>
BAR_R	GGATCCCTCATCAGATCTCGGTGACGGG	Amplificação da porção codificadora do gene <i>bar</i>
A4_NEST_FOR	TATGACCATGATTACCAGGGCTGGC CTGACTGCGG	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chimaA4</i>
A4_NEST_REV	CAGGTCGACTCTAGAGCAGGCGAAG GCCGCGGATG	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>chimaA4</i>

5.7. CLONAGEM DO CASSETTE DE DELEÇÃO Δ chimaA4 NO VETOR pPZP201BK

O *cassette* de deleção Δ chimaA4 foi primeiramente clonado no vetor pCR2.1TOPO de 3.900 pb (Figura 9), de acordo com protocolo do fabricante, a fim de obter maior quantidade e eficiência. Após, foi realizada a extração de DNA plasmidial por lise alcalina de acordo com Sambrook & Russell (2001). O material genético foi então digerido com as enzimas *Pst*I e *Hind*III (Figura 10) e o inserto purificado a partir de gel de agarose 0,8% com *kit* para purificação de ácidos nucleicos GFX (*Invitrogen*). Seguidamente, o *cassette* foi clonado no plasmídeo pPZP201BK de 6.794 pb próprio para agrotransformação, previamente digerido com as mesmas enzimas (tornando-o pPZP:: Δ chimaA4::bar) (Figura 11). Este plasmídeo foi utilizado para posterior transformação em *Agrobacterium tumefaciens* (Staats *et al.*, 2007b).

5.8. CONFIRMAÇÕES POR CLIVAGENS E PCR

Foram utilizadas as enzimas de restrição *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI e *Sac*I (Figura 12) em múltiplas clivagens, bem como a realização da PCR com os *primers* A4_NEST_FOR e A4_NEST_REV (Tabela 2) para obtenção do *amplicon* de 3.880 pb referente ao tamanho de todo o *cassette* de deleção Δ chimaA4 (Figura 13).

5.9. TRANSFORMAÇÃO EM *Agrobacterium tumefaciens*

Após a extração de DNA plasmidial de acordo com Sambrook & Russell (2001), o vetor pPZP:: Δ chiMaA4::bar foi transformado em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 por eletroporação (Sambrook & Russell, 2001).

5.10. AGROTRANSFORMAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae*

As células de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pPZP:: Δ chiMaA4::bar foram utilizadas para agrotransformação de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido (Staats *et al.*, 2007b). Brevemente,

uma alíquota de 100 μL da linhagem de *A. tumefaciens*, portando o vetor recombinante, crescidas até OD_{600} de 0,5 em meio IM (item 5.2.9), adicionado de 200 μM do indutor acetoseringona (item 5.2.12) foi co-cultivada com o mesmo volume de uma suspensão de esporos (item 5.4) diluída a 1×10^6 conídios. mL^{-1} de *M. anisopliae*. Após, esse co-cultivo foi distribuído em discos de celofane dispostos sobre IM sólido em placas de Petri com ou sem 200 μM de AS (controle negativo - placas sem AS) (item 5.2.12). Esse processo de inóculo permite a transferência do material inserido entre as bordas esquerda e direita do vetor para o sítio homólogo no genoma do fungo. As placas foram incubadas a 25 °C por 2 dias e então cobertas com meio *top* Ágar MM (item 5.2.13), contendo 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de glifosinato de amônio (item 5.2.15). As mesmas foram incubadas a 28°C e examinadas diariamente por 15 dias ou após o surgimento de colônias de *M. anisopliae* resistentes ao fungicida. Estas colônias foram isoladas em novas placas de petri com o mesmo meio seletivo e incubadas a 28°C até a esporulação (Figura 14).

5.11.MANIPULAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) DOS TRANSFORMANTES

O isolamento de DNA de conídios de cada isolado foi realizado conforme protocolo modificado de (Ferreira & Glass, 1996) para seleção dos transformantes positivos, contendo a marca de resistência ao glifosinato de amônio (gene *bar*). Uma alçada de conídios foi colocada em 30 μL de tampão TE (item 5.2.8) em tubos de *Eppendorf* de 500 μL fechados e com um orifício em cima. Os tubos foram submetidos a micro-ondas em potência máxima por 20 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 1.400 rpm por 10 minutos e foi recolhido o sobrenadante a novos tubos. Utilizou-se 5 μL da extração para experimentos de PCR.

5.12.SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES

Para realizar a seleção dos transformantes de *M. anisopliae* com inserção do *cassette* de deleção $\Delta\text{chimaA4}$, foram realizadas PCRs a partir do DNA de esporos (item 5.11) extraído de cada transformante que transpôs a camada de meio seletivo *top* Ágar (item 5.2.13) contendo glifosinato de amônio. Primeiramente, 5 μL

de DNA foi submetido a uma PCR negativa utilizando o par de *primer* [chiA4qPCR_F1 e chiA4qPCR_R1] que tem como produto de amplificação uma região interna do gene *chimaA4* (Tabela 3), resultando no *amplicon* de tamanho próximo a 200 pb (Figura 15). Posteriormente, as colônias que não apresentavam amplificação eram submetidas a nova reação de PCR , utilizando como molde 1 µL da mesma amostra diluída 1:50 a fim de eliminar impurezas que poderiam inibir a reação.

Tabela 3. Lista de *primers* utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do *cassette* de deleção do gene *chimaA4* no genoma fúngico.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Descrição
chiA4qPCR_F1	GCAACAACGCTTCCACGCCATT	Amplificação de uma região interna do gene <i>chimaA4</i>
chiA4qPCR_R1	ACCTTCTCCCACGCCCTGAAAG	Amplificação de uma região interna do gene <i>chimaA4</i>

6. RESULTADOS

6.1. CONSTRUÇÃO DO CASSETTE DE DELEÇÃO UTILIZANDO PCR DE FUSÃO

A partir de estudos anteriores do grupo (Junges, 2010), foi possível elaborar oligonucleotídeos que amplificam regiões 5' e 3' flangeadoras do gene *chimaA4*. Foi então realizada a amplificação das regiões 5' e 3' do gene *chimaA4* e do gene de resistência *bar* (conforme 5.6, **Figura 7**). As amostras purificadas da primeira amplificação foram utilizadas como molde para a reação de PCR do 2º round a fim de fusionar o *cassette* de expressão do gene *bar* às regiões 5' e 3' (Yu *et al.*, 2004). A partir do produto fusionado do 2º round, realizou-se uma reação de amplificação, utilizando os *primers* Nested os quais flanqueiam toda a região de deleção do gene *chimaA4*, amplificando 3.880 pb (**Figura 8**).

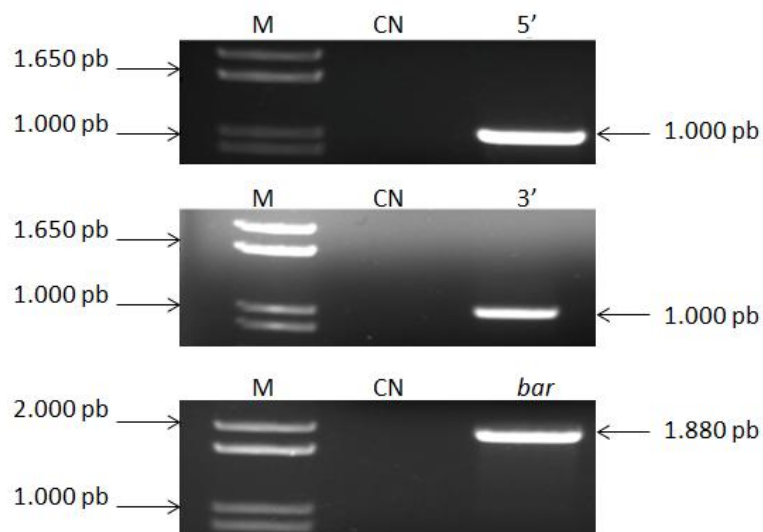


Figura 7. Amplificação das regiões do gene de interesse (1º round). Amplificação das regiões 5', 3' do gene *chimaA4* em 1.000 pb e do *cassette* para expressão do gene de resistência *bar* em 1.880 pb. M- marcador 1Kb Plus DNA Ladder, CN – controle negativo, 5', 3' e *bar* – regiões de interesse amplificadas.

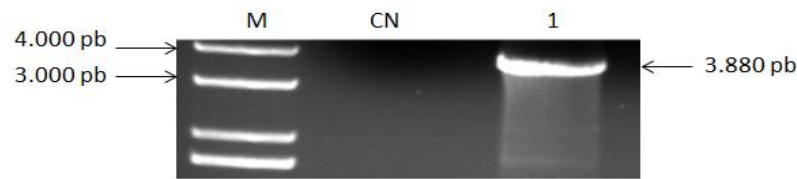


Figura 8. Amplificação do *cassette* de deleção do gene *chimaA4* (3° round). Amplificação das regiões 5' e 3' fusionadas ao *cassette* de expressão de *bar* utilizando os *primers* Nested. M- marcador 1Kb *Plus DNA Ladder*, CN – controle negativo, 1 – regiões de interesse amplificadas.

6.2. CLONAGEM DO CASSETTE DE DELEÇÃO Δ chimaA4 NO VETOR pPZP201BK

Após a fusão dos três fragmentos que formam o *cassette* de deleção do gene *chimaA4*, foi realizada a clonagem no vetor pCR2.1TOPO (Figura 9), extração de DNA plasmidial e clivagem com as enzimas *HindIII* e *PstI* (Figura 10). Após purificação, obteve-se o a construção de 3.880 pb que foi clonada no vetor binário pPZP201KB previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o vetor pPZP:: Δ chimaA4::*bar* (Figura 11).

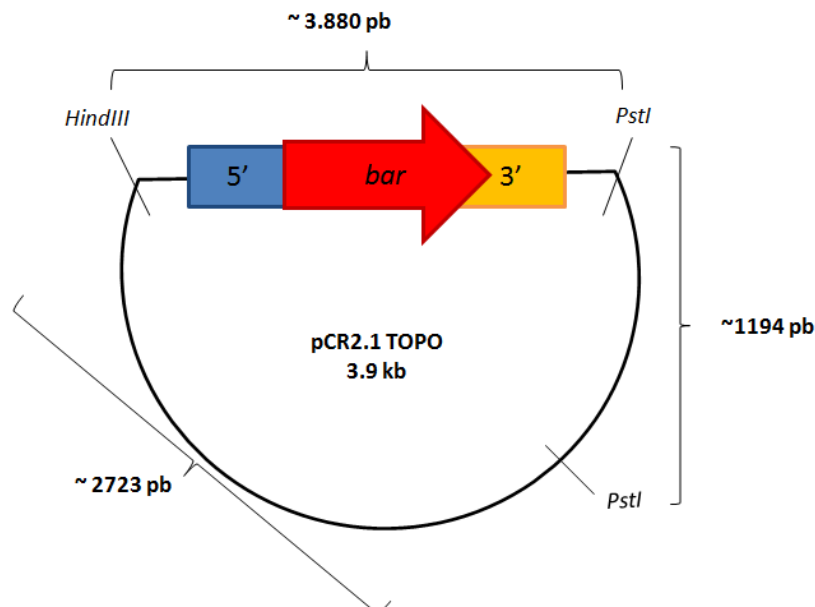


Figura 9. Representação esquemática da clonagem do *cassette* de deleção do gene *bar* no vetor pCR2.1TOPO. Estão apresentados na figura os sítios das enzimas de restrição utilizadas para clivagem e liberação da construção e os tamanhos moleculares esperados para os produtos da digestão.

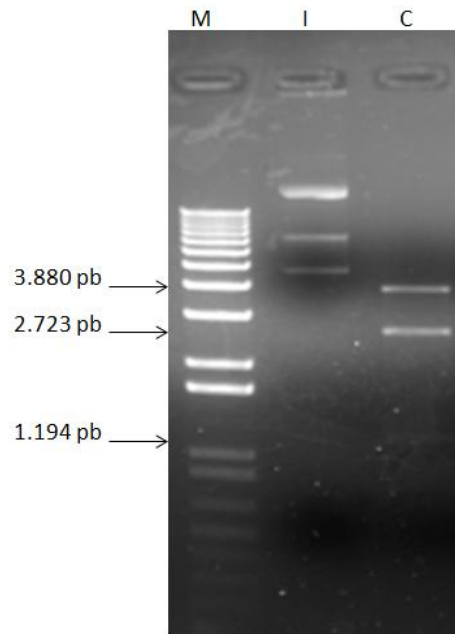


Figura 10. Confirmação da clonagem e orientação do *cassette* de deleção Δ chimaA4 no vetor pCR2.1TOPO. M= marcador 1kb *plus DNA ladder*; I= amostra de DNA plasmidial; C= Perfil da clivagem (enzimas de restrição *HindIII* e *PstI*) do pCR2.1TOPO contendo o *cassette* de deleção Δ chimaA4 de 3.880 pb.

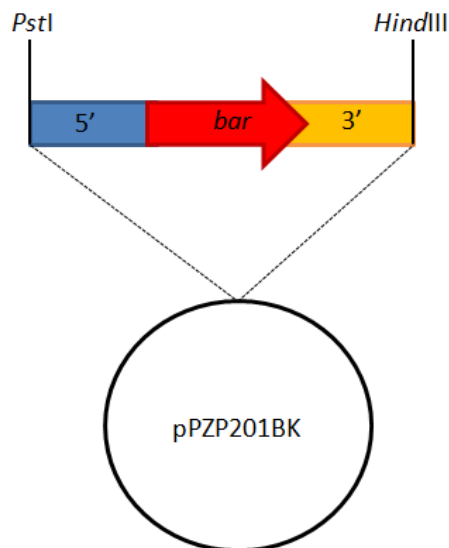


Figura 11. Representação esquemática da construção do vetor pPZP:: Δ chimaA4::*bar*. O plasmídeo pPZP201BK foi clivado através da digestão com as enzimas *PstI* e *HindIII* para posterior clonagem do *cassette* Δ chimaA4.

6.3. CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO

Para avaliar a presença do *cassette* de deleção em pPZP:: Δ chimaA4::bar, foi realizado uma PCR de colônia, na qual parte de uma colônia é empregada como molde da reação, utilizando *primers* que amplificam o gene *bar* (Tabela 2). As amostras positivas para a PCR foram inoculadas em meio LB e cultivadas por 16 horas com a finalidade de extrair DNA plasmidial. O DNA plasmidial extraído foi clivado primeiramente com as enzimas *Hind*III e *Pst*I liberando a construção e posteriormente algumas amostras de DNA plasmidial foram clivadas com *Bam*HI e *Sac*I (Figura 12). Essas reações de clivagem confirmaram a inserção do *cassette* de deleção Δ chimaA4 e sua orientação no vetor pPZP201BK através das bandas de 3.880 pb e 6.794 pb (Figura 13A) e das bandas de ~6.794, 2.450, 1.220 e 212 pb (Figura 13B). Também foi realizada a confirmação pela PCR [*primers* Nested] com a amplificação do *cassette* de deleção visualizada na banda de 3.880 pb (Figura 13C).

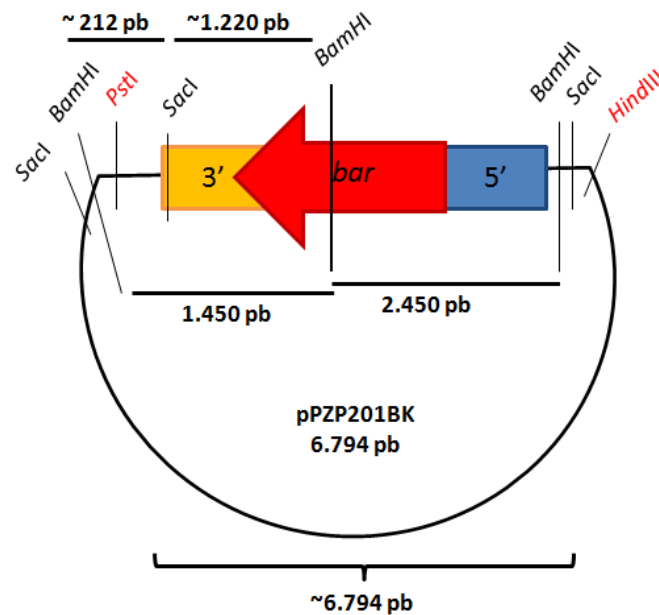


Figura 12. Representação esquemática da construção do plasmídeo pPZP:: Δ chiMaA4::bar. Estão apresentados na figura os sítios das enzimas de restrição utilizadas para confirmação da construção e os tamanhos moleculares esperados para os produtos da digestão.

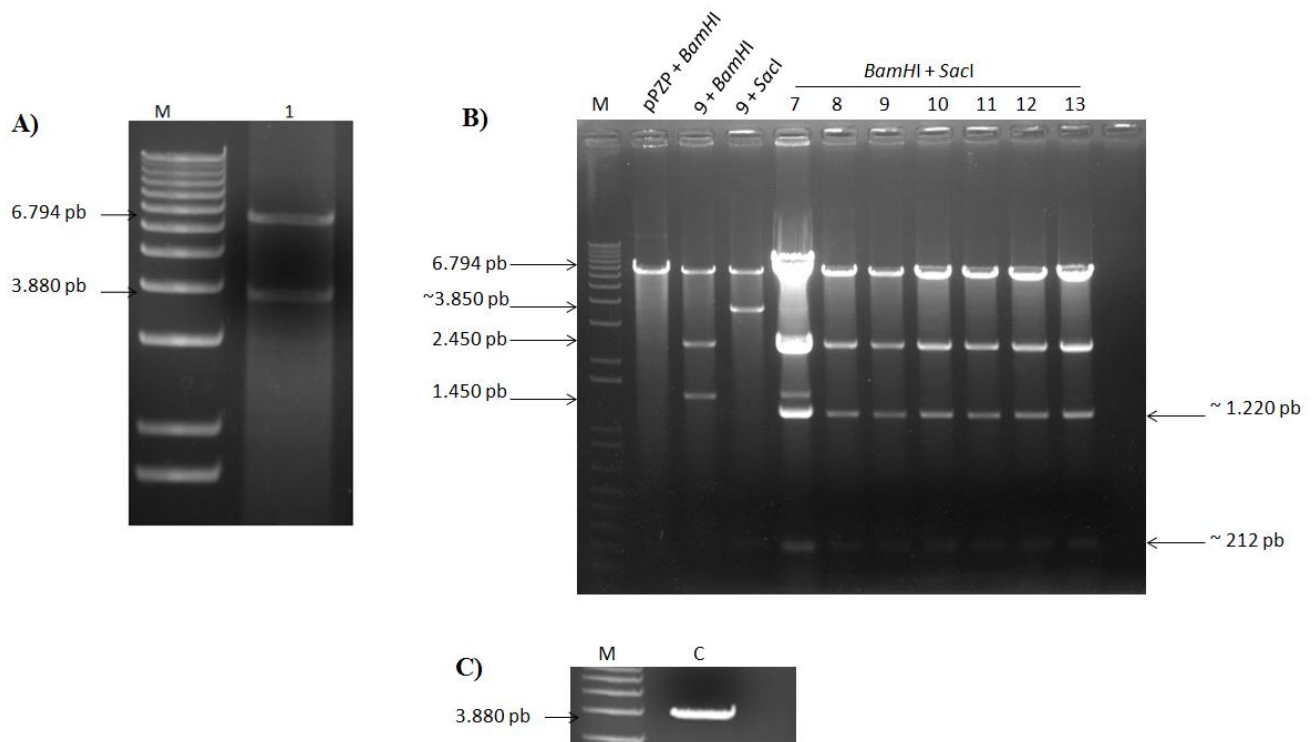


Figura 13. Confirmação da clonagem e orientação do *cassette* de deleção Δ chimaA4 no vetor pPZP201BK. A) Clivagem com as enzimas de restrição *Pst*I e *Hind*III. M= marcador 1kb *plus* DNA ladder; 1= amostra de DNA plasmidial com liberação do *cassette* de deleção (3.880 pb) e do vetor pPZP201BK (6.794pb). B) Perfil da clivagem do pPZP:: Δ chimaA4::bar com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I. 7, 8, 9, 10, 11, 12, e 13= amostras de DNA plasmidial com o *cassette* clivadas. C) Confirmação por PCR da construção. C= *cassette* de deleção Δ chimaA4.

6.4. AGROTRANSFORMAÇÃO DE *M. anisopliae* E SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES

Foram realizados dois experimentos de agrotransformação. O primeiro, experimento resultou em 100 transformantes que cresceram no meio *top* Ágar contendo glifosinato de amônio. Esses foram isolados em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de seleção (item 5.2.13), porém com 1,5% de ágar. (Figura 14). Inicialmente foi efetuada a seleção dos transformantes com deleção do gene *chimaA4* (recombinação homóloga), através da reação de PCR negativa, utilizando DNA de esporo e *primers* que amplificam a porção codificadora do gene *chimaA4* (Tabela 3). A banda de aproximadamente 200 pb no tipo selvagem, é referente a uma parte da ORF do gene *chimaA4*, ou nos transformantes com recombinação ectópica. Para confirmar a ausência do amplicon referente à *chimaA4* nas três amostras

negativas (**Figura 15**), foi realizada nova PCR utilizando como molde 1 μ L de uma diluição 1: 50 da mesma amostra, pois a extração de DNA de esporos pelo microondas pode conter enzimas que degradam DNA (DNases) ou até mesmo debris celulares que podem inibir a reação de PCR. Dos 100 transformantes, todos apresentaram recombinação ectópica observada pela banda de 200 pb (**Figura 15**).

Foi realizado um segundo experimento de agrotransformação. Após um período de 15 dias foram selecionados 287 transformantes de *M.anisopliae*. O DNA extraído de cada transformante está sendo submetido às reações de PCR. Dos 100 já analisados por PCR negativa, 4 não parecem apresentar a banda que amplifica parte da região codificadora do gene *chimaA4* (**Figura 15**). Apesar disso, novas reações de PCR devem ser feitas utilizando o DNA purificado dos transformantes, além de outra PCR com os primers do gene *bar*. Por fim, uma confirmação por *Southern blot* deve ser realizada.

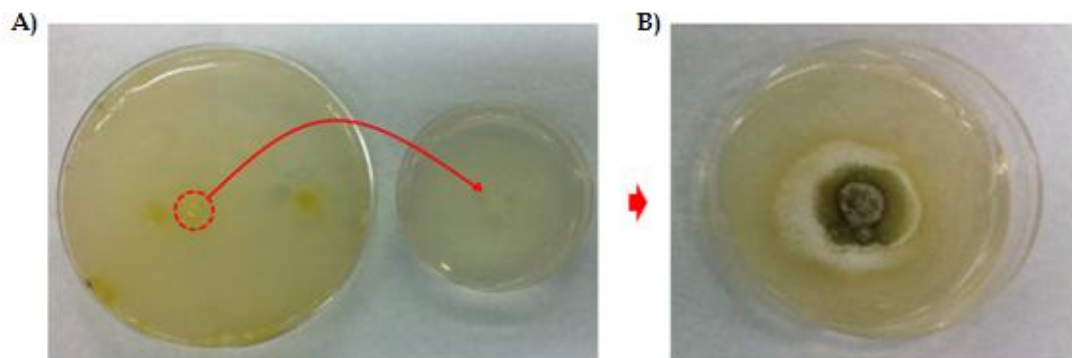


Figura 14. Isolamento dos possíveis transformantes. As placas foram cultivadas a 28°C por 10 dias. A) Isolamento das hifas dos possíveis transformantes em meio contendo glifosinato de amônio. B) Crescimento de um isolado.

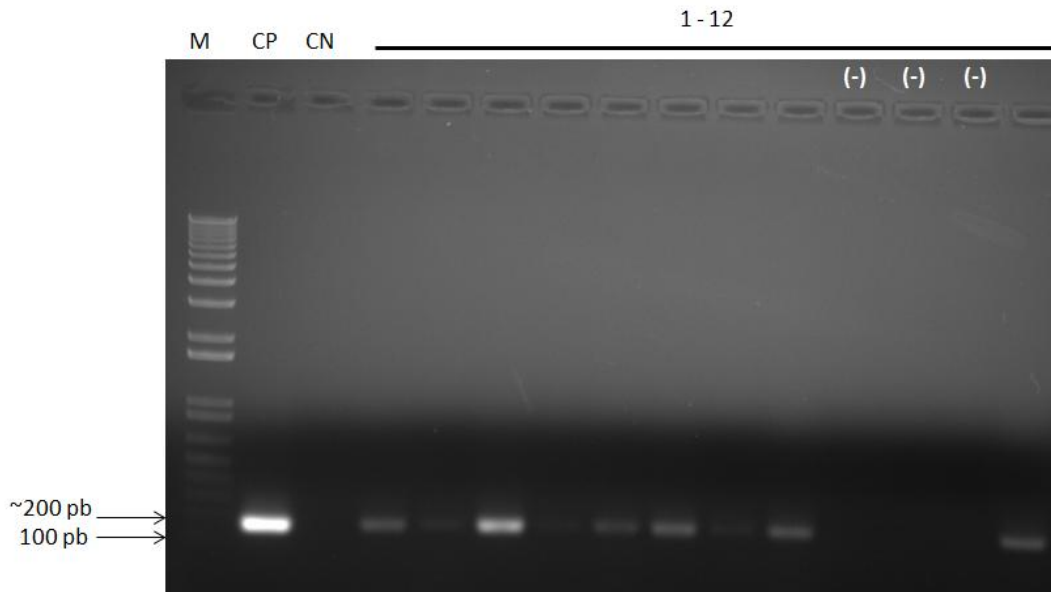


Figura 15. Seleção dos transformantes com inserção do *cassette* de deleção por PCR negativo (primeira agrotransformação). Representação de apenas 12 transformantes. M= marcador 1 Kb *plus DNA ladder*; CP= controle positivo (DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae*) com 200 pb; CN= controle negativo; (1-12)= transformantes testados pela PCR com os *primers* *chiA4qPCR_F1* e *chiA4qPCR_R1*; (-)= ausência da amplificação de 200 pb (possível recombinação homóloga).

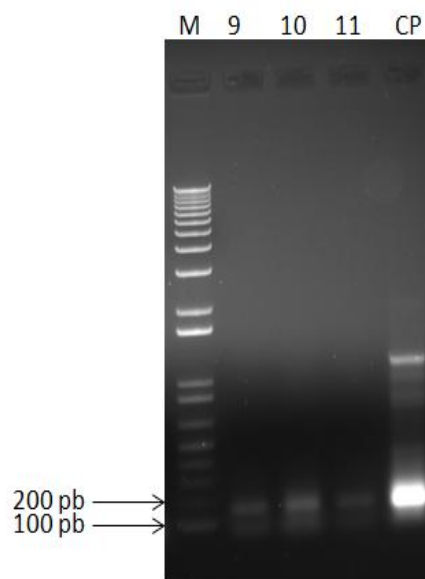


Figura 16. Seleção dos transformantes com inserção do *cassette* de deleção por PCR negativo, utilizando molde diluído 1:50. Representação dos 3 transformantes que não amplificaram no primeiro PCR. M= marcador 1 Kb *plus DNA ladder*; CP= controle positivo (DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae*) com 200 pb; (9,10,11)= transformantes testados pela PCR com os *primers* *chiA4qPCR_F1* e *chiA4qPCR_R1* (recombinação ectópica).

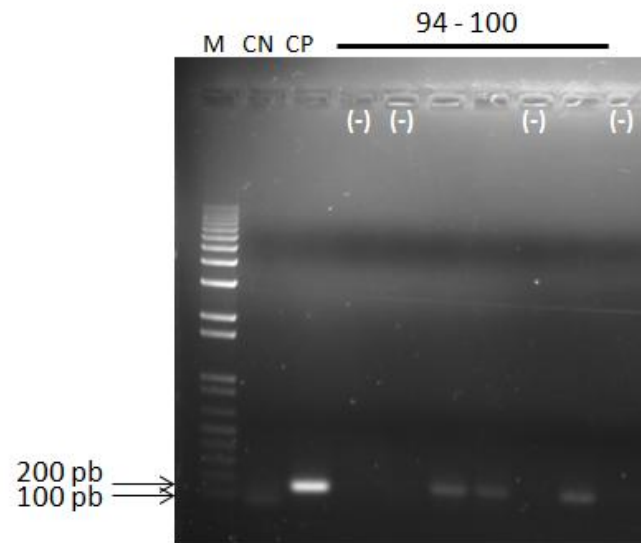


Figura 17. Seleção dos transformantes com inserção do *cassette* de deleção por PCR negativo (segunda agrotransformação). Representação de apenas 7 transformantes. M= marcador 1 Kb *plus* DNA *ladder*; CP= controle positivo (DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae*) com 200 pb; CN= controle negativo; (94-100)= transformantes testados pela PCR com os *primers* *chiA4qPCR_F1* e *chiA4qPCR_R1*; (-)= ausência da amplificação de 200 pb (possível recombinação homóloga).

7. DISCUSSÃO

Sabe-se que o genoma do fungo *M. anisopliae* traz a codificação de uma grande quantidade de quitinases. De modo a conseguir caracterizar cada quitinase se faz normalmente o uso de técnicas de biologia molecular. Neste trabalho, foi realizado a técnica de agrotransformação por *A. tumefaciens* para obter a deleção do gene *chimaA4*, a fim de caracterizá-lo funcionalmente.

O trabalho ocorreu através de duas tentativas de agrotransformação: na primeira, 100 transformantes foram obtidos. No entanto, nenhum recombinante homólogo foi confirmado. Na segunda, foram 287 transformantes. Até o presente momento, 100 foram testados quanto a efetividade da recombinação, sendo que em nenhum destes se confirmou a deleção do gene no sítio homólogo.

Segundo Krappmann (2007), com algumas exceções (como o eucarionte *Saccharomyces cerevisiae*), os fungos tendem naturalmente a favorecer a via de recombinação não-homóloga em detrimento da recombinação homóloga, o que torna as pesquisas de manipulação do genoma tediosas e na maioria das vezes requer uma quantidade enorme de tentativas até a obtenção de um resultado. Ainda de acordo com o mesmo autor, uma possível razão pela qual a recombinação não-homóloga é predominante na maioria dos fungos, e também em eucariontes mais complexos tais como plantas e mamíferos, seja devido à existência em abundância de sequências repetitivas em seus genomas.

De maneira a transpor esta dificuldade natural presente nos fungos, e para permitir maior sucesso nos índices de recombinação homóloga, algumas técnicas de comprovado sucesso tem sido aplicadas. Duas abordagens são possíveis para aumentar a eficiência de recombinação homóloga nos fungos: aumentar as chances da ocorrência do mecanismo homólogo ou prejudicar o mecanismo de recombinação não-homólogo (Krappmann, 2007).

Para a primeira abordagem, estudos baseados principalmente sobre *S. cerevisiae* (para os quais altas taxas de recombinação homóloga ocorrem) demonstram que o grupo de genes *RAD52* está envolvido neste mecanismo de recombinação homóloga (Symington, 2002). Para a segunda abordagem, a inativação da via NHEJ (Non-Homologous-End-Joining) demonstra ser uma ótima ferramenta para realizar manipulações genéticas com sucesso (Carvalho *et al.*,

2010). A deleção de genes do complexo de proteínas Ku e suas subunidades tais como o KU70 e KU80 atuam nas interações necessárias da via de recombinação não homóloga – NHEJ. A atuação do complexo de proteínas Ku, se dá através da sua ligação no final da dupla-hélice de DNA de modo não específico, e age como plataforma para o recrutamento subsequente de outras proteínas (Jeggo, 1998).

A segunda estratégia provou ser altamente eficiente, e com diversos resultados comprovado de altas taxas de recombinação homóloga em mutantes. Em 2004, Kooistra e colaboradores obtiveram taxas de recombinação homóloga de 4% para o tipo selvagem aumentada para 100% após a deleção do gene *ku80* no fungo *Kluyveromyces lactis*. No mesmo ano, Ninomiya e colaboradores obtiveram o aumento de taxas de 9% (selvagem) para 91% (*ku70Δ*) no fungo *Neurospora crassa*. Em *Aspergillus sojae*, Takahashi e colaboradores (2006), relatam aumento de recombinação de 1,4% (selvagem) para 75% (*ku70Δ*). *Sordaria macrospora*, em 2006, por Poggeler e colaboradores, apresenta taxas de recombinação homóloga entre 2,5 a 4,1% para o tipo selvagem contra >85% para *ku70Δ*. *Aspergillus fumigatus*, Krappmann e colaboradores, 2006, de 5 a 10% para tipo selvagem contra 96% *ku70Δ*.

A obtenção prévia de um mutante nulo do complexo Ku (*ku70Δ*, *ku80Δ* ou outros) para o *M. anisopliae* pode ser uma alternativa interessante previamente ao estudo funcional dos genes deste organismo. A utilização como ponto de partida de um mutante já propenso à recombinação homóloga facilitaria as posteriores pesquisas das funções não apenas da quitinase *chimaA4*, mas também das demais quitinases e de todos os demais genes do organismo.

8. CONCLUSÕES

- i) A partir da metodologia da PCR de sobreposição, foi construído o *cassette* de deleção do gene *chimaA4*;
- ii) O *cassette* de deleção do gene *chimaA4* foi clonado no vetor de agrotransformação pPZP201BK;
- iii) Foram realizadas duas agrotransformações: a primeira permitiu o isolamento de 100 colônias fúngicas resistentes a glifosinato de amônio, porém não houve a confirmação da recombinação homóloga. A segunda agrotransformação resultou em 287 transformantes, destes 100 foram submetidos a PCR negativa e quatro parecem ser possíveis mutantes.

9. PERSPECTIVAS

- i) Realizar a seleção dos 237 transformantes restantes por PCR.
- ii) Analisar o padrão de transcrição dos mutantes do gene *chimaA4* por RT-PCR, utilizando a linhagem E6 como controle positivo.
- iii) Confirmar, pela metodologia de *Southern blot*, a ausência da região codificante do gene *chimaA4* após a seleção dos transformantes pela PCR negativa.
- iv) Realizar análises fenotípicas nos mutantes em condições de indução e repressão do sistema quitinolítico, bem como analisar os processos de germinação, crescimento de hifas, esporulação, formação de apressório e formação de blastosporo.
- v) Analisar os mutantes através de bioensaios quanto a sua capacidade de infecção em hospedeiros artrópodes como o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* e com o carrapato *Rhipicephalus microplus*.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150(Pt 7), 2029-2035.
- Ansari, M. A., Vestergaard, S., Tirry, L., & Moens, M. (2004) Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *J Invertebr Pathol* 85(2), 89-96.
- Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol* 37(3-4), 231-244.
- Barbosa, L. R.; Queiroz, D. L.; Filho, W. R. (2013). Pragas de importância econômica. Embrapa. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto_2ed/Pragas.htm>
- Barson, G., Renn, N., & Bywater, A. F. (1994) Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J Invertebr Pathol* 64(2), 107-113.
- Bechara, I. J., Destefano, R. H., Bresil, C., & Messias, C. L. (2011) Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). *Braz J Biol* 71(1), 91-98.
- Bernard, M., & Latge, J. P. (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 9-17.
- Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Berger, M., Guimaraes, J. A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2013) Susceptibility of *Loxosceles* sp. to the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: potential biocontrol of the brown spider. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107(1), 59-61.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4), 512-530.
- Bogo, M. R., Rota, C. A., Pinto, H., Jr., Ocampos, M., Correa, C. T., Vainstein, M. H.,

- et al. (1998) A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* 37(4), 221-225.
- Boldo, J. T., do Amaral, K. B., Junges, A., Pinto, P. M., Staats, C. C., Vainstein, M. H., et al. (2010) Evidence of alternative splicing of the chi2 chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 462(1-2), 1-7.
- Boldo, J. T., Junges, A., do Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet* 55(5), 551-560.
- Broetto, L., Da Silva, W. O., Bailao, A. M., De Almeida Soares, C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2010) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 312(2), 101-109.
- Bruck, D. J. (2005). Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting medium and the rhizosphere: implications for pest management.
- Carvalho, N. D., Arentshorst, M., Jin Kwon, M., Meyer, V., & Ram, A. F. (2010) Expanding the ku70 toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(4), 1463-1473.
- Charnley, A. K. (1991) Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology* 12(5), 149-157.
- Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4(5), 197-203.
- Cohen-Kupiec, R., & Chet, I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9(3), 270-277.
- Crickmore, N. (2006) Beyond the spore--past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *J Appl Microbiol* 101(3), 616-619.
- Driver, F., Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000) A taxonomic revision

- of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104, 134-150.
- Duo-Chuan, L. (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161(6), 345-360.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Silveira Schrank, I., Henning Vainstein, M., & Schrank, A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res Microbiol* 155(4), 245-251.
- Fang, W., Pei, Y., & Bidochka, M. J. (2007) 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(Pt 4), 1017-1025.
- Ferreira, A. V. B., & Glass, N. L. (1996). PCR from fungal after microwave treatment. FGSC Home Page:Disponível em <<http://www.fgsc.net/fgn43/ferreir.html>>
- Frazzon, A. P., da Silva Vaz Junior, I., Masuda, A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 94(1-2), 117-125.
- Freimoser, F. M., Hu, G., & St Leger, R. J. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology* 151(Pt 2), 361-371.
- Freimoser, F. M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G., & St Leger, R. J. (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(Pt 1), 239-247.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., et al. (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7(1), e1001264.
- Gelvin, S. B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1), 16-37, table of

contents.

- Gillespie, J. P., Bateman, R., & Charnley, A. K. (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J Invertebr Pathol* 71(2), 128-137.
- Gooday, G. W., Zhu, W. Y., & O'Donnell, R. W. (2006) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiology Letters* 100(1-3), 387-391.
- Gruber, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012) Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158(Pt 1), 26-34.
- Haugland, R. A., Brinkman, N., & Vesper, S. J. (2002) Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J Microbiol Methods* 50(3), 319-323.
- He, M., & Xia, Y. (2009) Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings. *FEMS Microbiol Lett* 291(1), 127-135.
- Hu, G., & St Leger, R. J. (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol* 68(12), 6383-6387.
- Inyang, E., McCartney, H., & Oyejola, B. (2013) Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape.
- Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M., & Henrissat, B. (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett* 382(1-2), 186-188.
- Jeggo, P. A. (1998) DNA breakage and repair. *Advances in genetics* 38, 185-218.
- Junges, A. (2010) *Metarhizium anisopliae* : expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Kaaya, G. P., & Munyinyi, D. M. (1995) Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J Invertebr Pathol* 66(3), 237-241.
- Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E., & Charnley, A. K. (1999) The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J Invertebr Pathol* 74(3), 213-223.
- Kooistra, R., Hooykaas, P. J., & Steensma, H. Y. (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 21(9), 781-792.
- Krappmann, S. (2007) Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *21*(1), 25–29.
- Krappmann, S., Sasse, C., & Braus, G. H. (2006) Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell* 5(1), 212-215.
- Krueger, S. R. (2013) Soil treatment with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. *Biological control* 9(1), pp. 67-74(8).
- Latge, J. P. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66(2), 279-290.
- Leger, R. J. S. (2008) Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *98*(3), 271–276.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol* 46, 667-702.
- Lord, J. C. (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol* 89(1), 19-29.
- Lubeck, L., Arruda, W., Souza, B. K., Stanisçuaski, F., Carlini, C. R., & Schrank, A. a. V., M.H. (2008) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*.

- Luz, C., Tigano, M. S., Silva, I. G., Cordeiro, C. M., & Aljanabi, S. M. (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(6), 839-846.
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206, 4393-4412.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A., & Ram, A. F. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* 48(1), 1-17.
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Mpingwa, M. W., Lwetoijera, D. W., Knols, B. G., Takken, W., et al. (2011) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Res* 108(2), 317-322.
- Mochi, D. A., Monteiro, A. C., De Bortoli, S. A., Doria, H. O., & Barbosa, J. C. (2006) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. *Neotrop Entomol* 35(3), 382-389.
- Nakazato, L., Dutra, V., Broetto, L., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2006) Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(3), 521-528.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., & Inoue, H. (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33), 12248-12253.
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S. E., Weiblen, G. D., Bremer, B., Cizek, L., et al. (2002) Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature* 416(6883), 841-844.
- Nowierski, R. M., Zeng, Z., Jaronski, S., Delgado, F., & Swearingen, W. (1996) Analysis and Modeling of Time-Dose-Mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Paecilomyces* Isolates from

- Madagascar. *J Invertebr Pathol* 67(3), 236-252.
- Pal, S., St Leger, R. J., & Wu, L. P. (2007) Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 282(12), 8969-8977.
- Patil, R. S., Ghormade, V. V., & Deshpande, M. V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26(7), 473-483.
- Peng, G., Xie, L., Hu, J., & Xia, Y. (2009) Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Curr Genet* 55(3), 263-271.
- Pires, L. M., Marques, E. J., Oliveira, J. V., & Alves, S. B. (2010) [Selection of isolates of entomopathogenic fungi for controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and their compatibility with insecticides used in tomato crop]. *Neotrop Entomol* 39(6), 977-984.
- Poggeler, S., & Kuck, U. (2006) Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian ku70 ortholog. *Gene* 378, 1-10.
- Polar, P., de Muro, M. A., Kairo, M. T., Moore, D., Pegram, R., John, S. A., et al. (2005) Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol* 134(1-2), 159-167.
- Roberts, D. W., & St Leger, R. J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54, 1-70.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual. 3th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Scholte, E. J., Knols, B. G., & Takken, W. (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol* 91(1), 43-49.

- Scholte, E. J., Njiru, B. N., Smallegange, R. C., Takken, W., & Knols, B. G. (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J* 2, 29.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56(7), 1267-1274.
- Screen, S. E., Hu, G., & St Leger, R. J. (2001) 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(4), 260-266.
- Seidl, V. (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. 22(1), 36–42.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(5-6), 413-423.
- Silva, W. O. B., Santi, L., Berger, M., Pinto, A. F. M., Guimarães, J. A., Schrank, A., et al. (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* 44(8), 829-834.
- Sousa, N. A., Lobo, L. S., Rodrigues, J., & Luz, C. (2013) New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. *Lett Appl Microbiol*.
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13), 6349-6354.
- St Leger, R. J. (1991), Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58(3), 415-426.
- St Leger, R. J. (2008) Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J Invertebr Pathol* 98(3), 271-276.
- St Leger, R. J., Charnley, A. K., & Cooper, R. M. (1987) Characterization of cuticle-

- degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* 253(1), 221-232.
- St Leger, R. J., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992) Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120(1), 119-124.
- Staats, C. C. (2007a) Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Staats, C. C., Junges, A., Fitarelli, M., Furlaneto, M. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2007b) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 76(4), 945-950.
- Staats, C. C., Kmetzsch, L., Lubeck, I., Junges, A., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2013) *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol* 117(2), 137-144.
- Symington, L. S. (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(4), 630-670, table of contents.
- Takahashi, T., Masuda, T., & Koyama, Y. (2006) Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol Genet Genomics* 275(5), 460-470.
- Tounou, A. K., Kooyman, C., Douro-Kpindou, O. K., & Poehling, H. M. (2008) Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J Invertebr Pathol* 97(3), 203-210.
- Wang, C., Duan, Z., & St Leger, R. J. (2008) MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell*

- 7(2), 302-309.
- Wang, C., Hu, G., & St Leger, R. J. (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(8), 704-718.
- Wang, C., & St Leger, R. J. (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* 6(5), 808-816.
- Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 16(1), 31-44.
- Xia, Y., Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (2002) Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol* 80(3), 139-147.
- Xia, Y., Dean, P., Judge, A. J., Gillespie, J. P., Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (2000) Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Insect Physiol* 46(9), 1249-1257.
- Xia, Y., Gao, M., Clarkson, J., & Charnley, A. (2002) Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 80(2), 127-137.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. In *Fungal Genet Biol* (Vol. 41, pp. 973-981). United States.
- Zhang, C., & Xia, Y. (2009) Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Curr Genet* 55(4), 399-407.
- Zhao, H., Charnley, A. K., Wang, Z., Yin, Y., Li, Z., Li, Y., et al. (2006) Identification of an extracellular acid trehalase and its gene involved in fungal pathogenesis of

Metarizium anisopliae. *J Biochem* 140(3), 319-327.