

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

**Desenvolvimento de sistemas de análise da função
gênica para fungos entomopatogênicos:
Construção de linhagem Δ Ku70 em
*Metarhizium anisopliae***

Trabalho de Conclusão de Curso

Alexia de Matos Czczot

Porto Alegre, 2016

**Desenvolvimento de sistemas de análise da função
gênica para fungos entomopatogênicos:
Construção de linhagem Δ Ku70 em
*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.

Alexia de Matos Czczot

Orientador: Augusto Schrank

Porto Alegre, 2016

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram a tornar este trabalho possível ou tiveram alguma interferência na minha formação. Deixo aqui meu muito obrigada de forma geral, ressaltando a importância de algumas pessoas que foram essenciais.

Agradeço aos meus pais, Mario e Sandra, que sempre me apoiaram e incentivaram minhas decisões. Muito obrigada pelo amor e dedicação e por tornarem este sonho possível.

Ao meu irmão Leonardo, que sempre me incentivou e demonstrou orgulho de mim, e a minha cunhada Thaís pela parceria e amizade.

Ao meu amor Lucas, por todos os sentimentos bons ao longo destes anos. Sou grata por todo apoio, confiança e amor. Obrigada por sempre estar ao meu lado e me transmitir calma.

Ao Professor Augusto pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório: Ângela, Nicolau e Thaís pelo convívio, paciência e ajuda na parte teórica e prática, sem eles este trabalho não teria tal desenvolvimento.

Aos meus colegas e amigos de graduação pelo companheirismo de todos os dias, em especial para a minha dupla fiel, Karina. Aos meus amigos e familiares pelo apoio emocional e pela compreensão da minha ausência em alguns momentos.

RESUMO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um organismo-modelo para o estudo das interações patógenos-hospedeiros. A caracterização da função gênica pela construção de mutantes nulos é uma das abordagens mais utilizadas para caracterizar a infecção, realizada a partir da interrupção do *locus* de interesse via recombinação homóloga. No entanto, a geração de mutantes nulos por recombinação homóloga exibe baixa eficiência em fungos filamentosos uma vez que a recombinação não homóloga é a principal via de reparo. Entre as proteínas envolvidas neste processo estão o heterodímero Ku, proteína quinase dependente de DNA e o complexo ligase IV-Xrcc4. Sabe-se que mutantes na via de recombinação não homóloga aumentam a frequência de recombinação homóloga. Portanto, o objetivo deste trabalho é obter mutantes para o gene *ku70*, a fim de aumentar a taxa de recombinação homóloga para que, posteriormente, possam ser construídos, com maior eficiência, mutantes funcionais para genes alvo em *M. anisopliae*. Para isso, foi construído um *cassette* de deleção para o gene *ku70*, que foi clonado no vetor binário pPZP201BK, construindo o vetor pPZP:: Δ Ku70::nat. Este vetor foi utilizado na transformação de *M. anisopliae* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Desta transformação, foram obtidos seis mutantes com o *locus* do gene *ku70* interrompido. Estes mutantes foram submetidos a teste de tolerância a estressores abióticos a fim de avaliar se a sensibilidade a estes compostos foi alterada. A taxa de crescimento e morfologia foram similares às da linhagem selvagem. Além disso, para confirmar o aumento da recombinação homóloga, cinco mutantes foram utilizados na construção de um mutante nulo para o gene *chimaD1*. Esta análise inicial indica que a taxa de recombinação homóloga aumentou de 1 % na linhagem selvagem para aproximadamente 40 % na linhagem Δ ku70. A eficiência de infecção dos mutantes, avaliada por bioensaio com *Ulomoides dermestoides*, indicou ausência de diferença entre a linhagem selvagem e a linhagem Δ ku70.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is a model to study host-pathogen interactions. The characterization of gene function by the construction of null mutants is one of the most used approaches to characterize the infection, and it requires the interruption of the locus of interest by homologous recombination. However, generation of null mutants by homologous recombination exhibits low efficiency in filamentous fungi because non-homologous end joining is the major repair pathway. Among the proteins involved in this process are the heterodimer Ku, the DNA-dependent protein kinase and the LigIV-Xrcc4 complex. It is known that knockout strains of genes responsible for the non-homologous end joining pathway increase the frequency of homologous recombination. Therefore, the present study aims to obtain *ku70* knockout strains in order to increase the homologous recombination rate and to develop functional mutants in *M. anisopliae* more efficiently. Thus, it was constructed a *ku70* gene deletion cassette which was cloned into pPZP201BK vector, originating the pPZP:: Δ Ku70::nat vector. This vector was used in transformation of *M. anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. As a result, six mutants exhibiting the disrupted *ku70* locus were obtained. These mutants were subjected to abiotic stress to evaluate if the sensitivity to some compounds was affected. The growth rate and morphology from the mutants were similar to the wild type strain. Moreover, to confirm the increase of homologous recombination rates, five mutants were analysed by constructing a *chimaD1* knockout strain. This initial analysis indicates that homologous recombination increased from 1 % in wild type strain to 40 % in *ku70* knockout strain. The infection efficiency evaluated in bioassays with *Ulomoides dermestoides* indicated no difference between wild type strain and *ku70* knockout strain.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> : Características gerais.....	11
1.2 Processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
1.3 Estudos funcionais em <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
1.4 Recombinação homóloga em fungos filamentosos.....	15
1.5 Recombinação não homóloga em fungos filamentosos.....	17
1.6 Aumento da frequência de recombinação homóloga em fungos filamentosos.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. JUSTIFICATIVA	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Linhagens.....	24
4.2 Meios de Cultura.....	24
4.3 Soluções e Enzimas Utilizadas.....	25
4.4 Construção do <i>cassette</i> de inativação do gene <i>Ku70</i>	25
4.5 Clonagem do <i>cassette</i> Δ <i>Ku70</i> no vetor pPZP201BK e Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT).....	26
4.6 Seleção dos transformantes e confirmação dos mutantes.....	27
4.7 Análise fenotípica dos mutantes.....	27
4.7.1 Tolerância a estressores abióticos.....	27
4.8 Construção do mutante Δ D1 de <i>M. anisopliae</i> utilizando o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1.....	28
4.8.1 Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT).....	28
4.8.2 Seleção dos transformantes e confirmação dos mutantes.....	28

4.9 Bioensaio com <i>Ulomoides dermestoides</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>ku70</i>	30
5.2 Construção do vetor pPZP:: Δ Ku70::nat.....	30
5.2.1 Clonagem do <i>cassette</i> Δ Ku70 no vetor pPZP201BK.....	30
5.2.2 Confirmação da construção	32
5.3 Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e seleção dos transformantes.....	33
5.4 Confirmação dos mutantes.....	34
5.5 Análise fenotípica: Tolerância dos mutantes a estressores abióticos.....	36
5.6 Construção do mutante Δ D1 de <i>M. anisopliae</i> utilizando o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1	37
5.7 Bioensaio com <i>Ulomoides dermestoides</i>	39
6. CONCLUSÕES	41
7. PERSPECTIVAS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE ABREVIÇÕES, SÍMBOLOS E UNIDADES

Δ (gene)	Linhagem com deleção do gene subsequente
ATMT	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
LB	Meio Luria-Bertani
Kb	Quilobase
pb	Pares de base
M	Molar
MC	Meio de Cove
MCC	Meio de Cove completo
mM	Milimolar
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por Mililitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> linhagem E6.....	11
Figura 2. Ciclo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
Figura 3. Esquema da via de recombinação homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA.....	16
Figura 4. Esquema para ilustrar eventos de recombinação homóloga na construção de mutantes funcionais.	17
Figura 5. Esquema da via de recombinação não homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA	18
Figura 6. Representação esquemática das etapas de construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>ku70</i>	25
Figura 7. Amplificação do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>ku70</i>	30
Figura 8. Representação esquemática da clonagem do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>ku70</i> no vetor pCR-2.1-TOPO	31
Figura 9. Representação esquemática da construção do vetor pZP:: Δ ku70::nat ...	31
Figura 10. Confirmação da clonagem do <i>cassette</i> de deleção Δ Ku70 no vetor pZP201BK.....	33
Figura 11. <i>Screening</i> dos transformantes obtidos a partir da agrotransformação de <i>M. anisopliae</i> com plasmídeo pZP:: Δ Ku70::nat	34
Figura 12. Purificação da sonda utilizada no <i>Southern blot</i> para confirmação dos mutantes Δ ku70 de <i>M. anisopliae</i>	34
Figura 13. Representação da hibridização entre o DNA da linhagem selvagem e Δ ku70 digeridos com as enzimas <i>EcoRV</i> e <i>NcoI</i> e a sonda utilizada no <i>Southern blot</i>	35
Figura 14. Confirmação dos transformantes por <i>Southern blot</i>	35
Figura 15. Tolerância dos mutantes a estressores abióticos	37
Figura 16. <i>Screening</i> dos transformantes obtidos a partir da agrotransformação de <i>M. anisopliae</i> Δ Ku70 T4 com plasmídeo pZP201BK- Δ ChimaD1	38
Figura 17. Bioensaio	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de fungos filamentosos que apresentaram aumento na taxa de recombinação homóloga pela metodologia de inativação de genes da via de recombinação não homóloga.21

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados para construção do *cassette* deleção do gene *ku70*26

Tabela 3. Lista de *primers* utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do *cassette* de deleção do gene *ku70* no genoma fúngico27

Tabela 4. Lista de *primers* utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do *cassette* de deleção do gene *chimaD1* no genoma fúngico29

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Metarhizium anisopliae*: Características gerais

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentososo entomopatogênico isolado pela primeira vez em 1879 de larvas do besouro *Anisopliae austriaca* e descrito como *Entomophthora anisopliae* por Metschnikoff. Em 1883, Sorokin o descreveu com o gênero *Metarhizium*. Este fungo está disperso mundialmente com exceção da Antártica e é isolado principalmente de insetos infectados e do solo (Roberts & St Leger, 2004).

Morfologicamente, *M. anisopliae* possui micélio hialino e septado, com conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos com coloração esverdeada organizados em colunas (Bischoff, Rehner & Humber, 2009) (Figura 1).

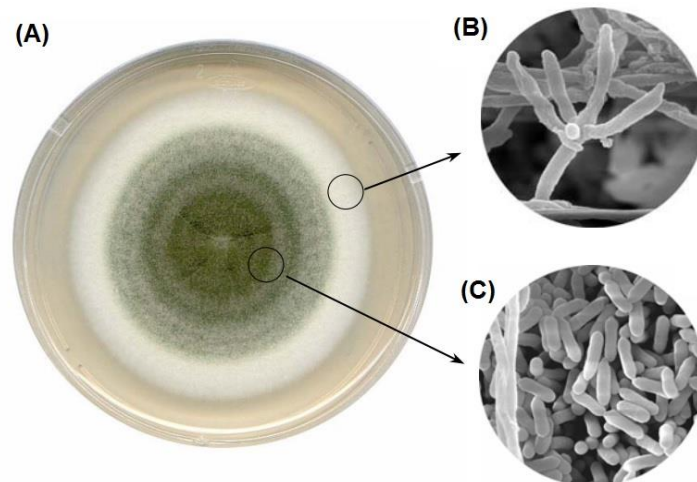


Figura 1. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae* linhagem E6. Colônia após 21 dias de cultivo em meio de Cove completo (MCC) a 28°C. A) Micélio hialino de coloração branca na extremidade da colônia de onde emergem os conidióforos. B) Conidióforos. C) Esporos cilíndricos. As micrografias de varredura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

O fungo *M. anisopliae* é capaz de infectar mais de trezentas espécies de hospedeiros artrópodes (Charnley, 1991), sendo responsável pela infecção fúngica *green muscardine*, que consiste na incrustação dos cadáveres de insetos com conídios verdes (Roberts & St Leger, 2004).

M. anisopliae é considerado um organismo modelo para o estudo das interações entre entomopatógenos e seus hospedeiros. Além disso, apresenta um

amplo espectro de hospedeiros e é muito utilizado como agente de controle biológico, pois muitos de seus hospedeiros abrangem espécies praga da agricultura e da pecuária e também vetores de doenças (Schrank & Vainstein, 2010). Entre estes hospedeiros estão o mosquito transmissor da malária *Anopheles gambiae* (Scholte *et al.*, 2006), o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (Scholte *et al.* 2007), o vetor da doença de Chagas *Triatoma infestans* (Juarez *et al.*, 2000), o carrapato bovino *Boophilus microplus* (Arruda *et al.* 2005) e o inseto manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (Santi *et al.*, 2006).

1.2 Processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

O ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae* consiste em um processo multifatorial que envolve diversas etapas, resultando em um mecanismo de infecção bastante eficiente (Figura 2). Ao contrário de muitos patógenos, a penetração deste fungo independe da ingestão do mesmo pelo hospedeiro, ocorrendo uma penetração ativa na superfície do hospedeiro (Leemon & Jonsson, 2012).

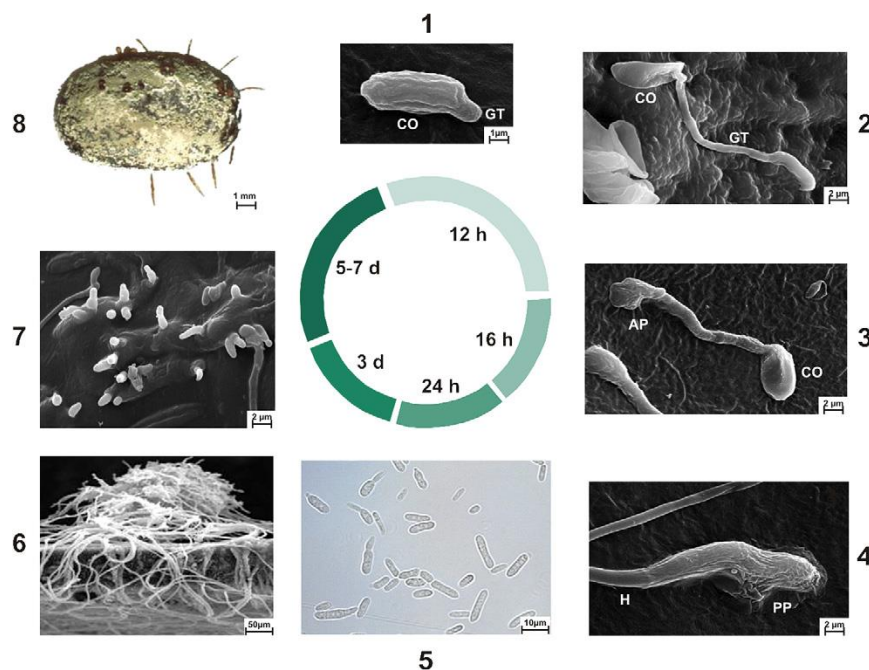


Figura 2. Ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae*. (1) Adesão do conídio na superfície do hospedeiro; (2) Germinação do conídio; (3) Diferenciação da extremidade apical do tubo germinativo em apressório; (4) Penetração; (5) Blastosporos na hemolinfa do artrópode; (6) Colonização; (7) Extrusão das hifas a partir do cadáver do inseto; (8) Conídios e conidióforos sobre a superfície do cadáver. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP- apressório, H- hifa, PP- penetração (Schrank & Vainstein, 2010).

A primeira e principal barreira que *M. anisopliae* enfrenta no momento da infecção é a cutícula de seus hospedeiros (Dubovskiy *et al.*, 2013). Esta cutícula é composta por duas camadas, a epicutícula e a procutícula, as quais são formadas por fibrilas de quitina embebidas em uma matriz proteica juntamente com lipídios e quinonas (Clarkson & Charnley, 1996). A primeira interação do fungo com o hospedeiro envolve interações hidrofóbicas e atuação de algumas proteínas, como adesinas e hidrofobinas que auxiliam na adesão do fungo, sendo as hidrofobinas responsáveis pelas interações com os componentes hidrofóbicos da superfície do hospedeiro (Sevim *et al.*, 2012).

Uma adesina envolvida na primeira etapa de infecção é a MAD1. Situada na superfície do esporo sua função é orientar o citoesqueleto, sendo a sua deleção responsável pela perda de cerca de 90% da capacidade de adesão de *M. anisopliae* na superfície de insetos (Wang & St. Leger, 2007). Além disso, a inibição da atividade de uma ecto-fosfatase por inibidores específicos de fosfatases foi capaz de reduzir a adesão do fungo na superfície do hospedeiro *Dysdercus peruvianus*, indicando sua participação neste processo (Cosentino-Gomes *et al.*, 2013). Outro fator que possivelmente está envolvido nesta etapa são as lipases, uma vez que *M. anisopliae* submetido a um inibidor de lipases foi incapaz de infectar seu hospedeiro *Rhipicephalus microplus* (Beys-Da-Silva *et al.*, 2010).

Após a adesão, ocorre a germinação dos conídios e a diferenciação das hifas em apressório, uma estrutura especializada na penetração dos hospedeiros (Arruda *et al.*, 2005). Nesta etapa de penetração, o fungo combina pressão mecânica com a secreção de enzimas hidrolíticas, a fim de romper a cutícula do hospedeiro (Clarkson & Charnley, 1996). Entre as enzimas secretadas estão as quitinases, proteases e lipases que são responsáveis por degradar os componentes quitinosos, proteicos e lipídicos presentes na superfície do hospedeiro, permitindo a penetração das hifas e o acesso à hemolinfa do hospedeiro (Santi *et al.*, 2010).

Na hemolinfa ocorre uma diferenciação celular das hifas em blastosporos, que consistem em estruturas unicelulares leveduriformes responsáveis pela nutrição, escape ao sistema imune do hospedeiro, e pela colonização e morte do hospedeiro (Zhang & Xia, 2009). Nesta etapa, o fungo secreta metabólitos secundários, sendo as destruxinas a classe predominante. Esta classe de metabólito secundário é caracterizada por serem fatores de virulência que aceleram a morte do hospedeiro

devido ao enfraquecimento das defesas imunitárias e à capacidade de dificultar a alimentação e a mobilidade do hospedeiro (Schrank & Vainstein, 2010).

Após a morte do hospedeiro, ocorre a extrusão das hifas e formação de novos conídios. Estes conídios na superfície do cadáver permitem a propagação do fungo e um novo ciclo de infecção se inicia quando *M. anisopliae* entra em contato com um hospedeiro suscetível (Schrank & Vainstein, 2010).

1.3 Estudos funcionais em *Metarhizium anisopliae*

Estudos funcionais em *Metarhizium anisopliae* são essenciais para elucidar mecanismos de infecção e compreender as interações entre entomopatógenos e seus hospedeiros (Jiang *et al.*, 2013). Para uma melhor compreensão de seu processo infeccioso, é necessário determinar quais proteínas são produzidas por este fungo durante a infecção, assim como conhecer seus mecanismos de regulação e suas respectivas funções (Barreto *et al.*, 2004).

A manipulação gênica é uma abordagem chave em estudos funcionais. Para isto, após o isolamento e a caracterização de genes alvo, uma das estratégias é a construção de mutantes nulos (mutantes funcionais) e a verificação da perda de função. Estes mutantes apresentam a interrupção de um determinado *locus* alvo pela inserção de um fragmento de DNA que interrompe a expressão do gene alvo, a qual ocorre via recombinação homóloga (Krappmann, 2007). Nestes mutantes funcionais são realizadas análises das alterações fenotípicas que ocorrem. Dessa forma é possível identificar em quais processos um determinado gene está envolvido e qual a sua função neste organismo (Weld *et al.*, 2006).

Genes envolvidos na patogênese deste fungo, bem como em outros estágios do desenvolvimento, têm sido clonados e caracterizados (St Leger *et al.*, 1992a,b; Bogo *et al.*, 1998; Baratto *et al.*, 2006). Além disso, alguns genes já tiveram sua atividade interrompida, a fim de determinar as funções de seus produtos. Entre estes genes está o gene *chi2* (*ChiMaB1*; Junges *et al.*, 2014), que codifica a quitinase CHI2 (*ChiMaB1*), sendo sua inativação responsável pela redução na eficiência de infecção de *M. anisopliae* no seu hospedeiro *Dysdercus peruvianus*, demonstrando que possui uma função importante no processo patogênico (Boldo *et al.*, 2009). Outro gene inativado que resultou em uma menor patogenicidade foi *chi3* (*ChiMaB2*; Junges *et al.*, 2014), o qual codifica a quitinase CHIT30 (*ChiMaB2*). Além de apresentar potencial

função no processo infeccioso, este gene foi relacionado com a adaptação do fungo a estresse por choque térmico (Staats *et al.*, 2013). No entanto, não há um entendimento completo de suas funções e atividades. Além disso, em alguns casos, a disrupção de um único gene pode não acarretar em mudanças globais na infecção, uma vez que essa é consequência de ações sinérgicas de proteínas, sendo necessário a obtenção de mutantes múltiplos (Krieger de Moraes *et al.*, 2003).

A obtenção de mutantes nulos é complexa devido a necessidade de utilizar o sistema de recombinação celular para interromper o *locus* de interesse (Krappmann, 2007). Este sistema está caracterizado em diversos organismos, incluindo fungos filamentosos. A seguir faremos uma breve descrição.

1.4 Recombinação homóloga em fungos filamentosos

A recombinação homóloga é a via de transferência de DNA entre sequências homólogas. Esta via atua no reparo de quebras duplas na cadeia de DNA que ocorrem espontaneamente ou induzidas a partir da exposição a agentes causadores de danos no DNA (Symington, 2002).

O reparo por recombinação homóloga envolve diversas proteínas e, para que este reparo ocorra, é necessário o reconhecimento do dano por um complexo proteico, denominado complexo MRX, o qual é composto pelas proteínas Mre11, Rad50 e Xrs2. Este complexo, além de reconhecer moléculas de DNA com quebras duplas, é capaz de recrutar outras proteínas para proceder ao reparo (Williams *et al.*, 2008). Sae2 é uma das proteínas recrutadas que atua sinergicamente com o complexo MRX nos passos iniciais do reparo, participando da excisão de pares de bases que ocorre nas extremidades do DNA danificado (Cannavo & Cejka, 2014). Outras proteínas que são recrutadas e participam do processamento destas extremidades são as nucleases Dna2 e Exo1 responsáveis pela digestão, atuando em conjunto com a helicase Sgs1, que desenrola o DNA expondo regiões de DNA fita simples (Zhu *et al.*, 2008).

Após as extremidades terem sido processadas para gerar extremidades de fita simples 3'-OH, a proteína RPA liga-se ao DNA, a fim de eliminar possíveis estruturas secundárias. A proteína mediadora Rad52 faz a interação entre as sequências homólogas e um nucleofilamento é formado quando a proteína Rad51 se liga ao DNA de fita simples, sendo capaz de invadir o DNA homólogo. Com o alinhamento das regiões homólogas, a síntese de DNA ocorre pela ação da DNA polimerase,

reparando o dano da molécula (Cejka, 2015) (Figura 3).

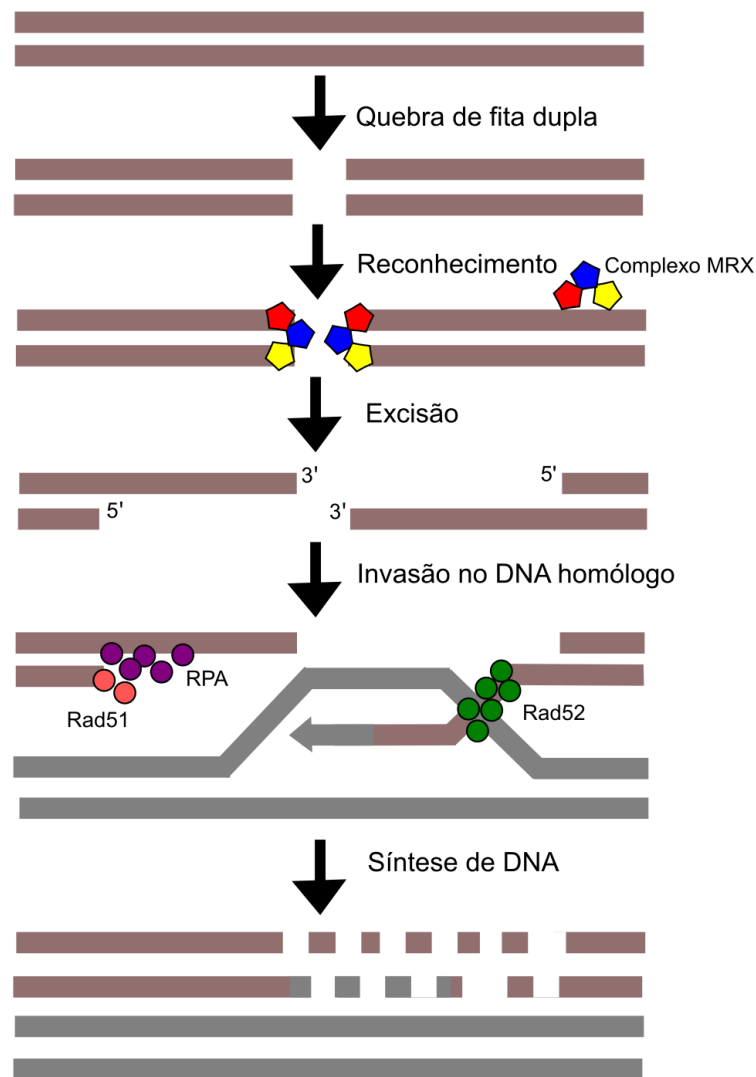


Figura 3. Esquema da via de recombinação homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA. Figura baseada em (Fell & Schild-Poulter, 2015; Cejka, 2015).

Em estudos funcionais em fungos filamentosos, a transformação do DNA mediada por recombinação homóloga é utilizada para substituir ou interromper um *locus* específico. Nesta metodologia, o gene alvo é interrompido por um *cassette* de inativação que contém uma marca de resistência. Esta marca está flanqueada por sequências homólogas às sequências do *locus* alvo, possibilitando a recombinação homóloga entre o DNA genômico e o *cassette* de inativação. Assim, quando ocorrer recombinação homóloga, a expressão do gene de interesse será inibida (Kück & Hoff, 2010) (Figura 4).

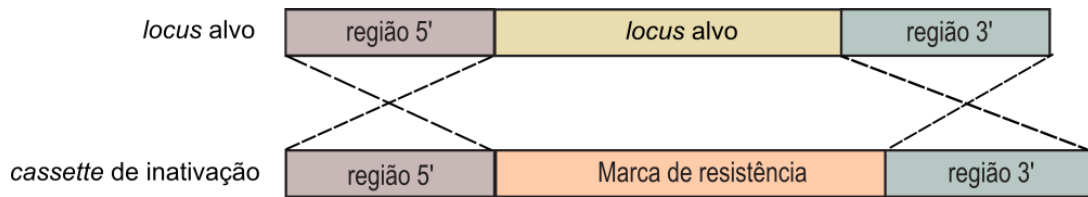


Figura 4. Esquema para ilustrar eventos de recombinação homóloga na construção de mutantes funcionais. A inativação de um *locus* alvo ocorre a partir da inserção de um fragmento de DNA contendo uma marca de resistência. Esta é flanqueada por sequências homólogas às sequências adjacentes do *locus* alvo possibilitando a recombinação homóloga entre o DNA genômico e o *cassette* de inativação. Figura baseada em (Kück & Hoff, 2010).

Em fungos filamentosos, a frequência de recombinação em um sítio específico é muito baixa, menor que 1% em alguns casos, ocorrendo, predominantemente, integração ectópica no genoma fúngico (Kück & Hoff, 2010). Isto ocorre devido à recombinação homóloga competir com a via de recombinação não homóloga, que consiste na principal alternativa para o reparo de quebras de fita dupla de DNA (Krappmann, 2007).

1.5 Recombinação não homóloga em fungos filamentosos

O reparo de quebras duplas na cadeia de DNA é essencial para a manutenção da integridade genômica. Em muitos organismos, incluindo fungos filamentosos, a recombinação não homóloga é a via principal de reparo (Krappmann, 2007). Esta via está ativa em todas as fases do ciclo celular pois independe de sequências homólogas. Além disso, este processo compreende algumas etapas específicas que envolvem diferentes proteínas (Fell & Schild-Poulter, 2015).

A primeira etapa da via de recombinação não homóloga é o reconhecimento da ruptura do DNA, o qual ocorre pela proteína Ku, que consiste em um heterodímero composto pelas subunidades Ku70 e Ku80. A subunidade Ku70 possui um domínio de ligação ao DNA e alta afinidade por moléculas de DNA contendo quebras de fita dupla, permitindo o reconhecimento rápido de moléculas de DNA com danos. Já a subunidade Ku80 apresenta um domínio de ligação à proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), recrutando esta proteína quando o heterodímero está interagindo com a molécula de DNA (Walker, Corpina & Goldberg, 2001; Fell & Schild-Poulter, 2015).

Quando a DNA-PK se liga à subunidade Ku80, ocorre uma autofosforilação,

originando um complexo DNA-PK ativo. Esse complexo ativo induz mudanças conformacionais na fita de DNA facilitando o processamento efetuado pela endonuclease Artemis nas extremidades danificadas (Goodarzi *et al.*, 2006). Este processamento é necessário para o recrutamento de outras proteínas, tais como polimerases, nucleases e quinases que criam extremidades compatíveis para a ligação das extremidades do DNA corrigidas.

O complexo de ligação composto pela Ligase IV, XRCC4 e XLF possui função de ligar as duas extremidades do DNA. Este complexo é recrutado interagindo diretamente com o heterodímero Ku (Mari *et al.*, 2006). Após esse processo, Ku é removida, possivelmente por degradação por proteases e via de ubiquitinação (Fell & Schild-Poulter, 2015) (Figura 5).

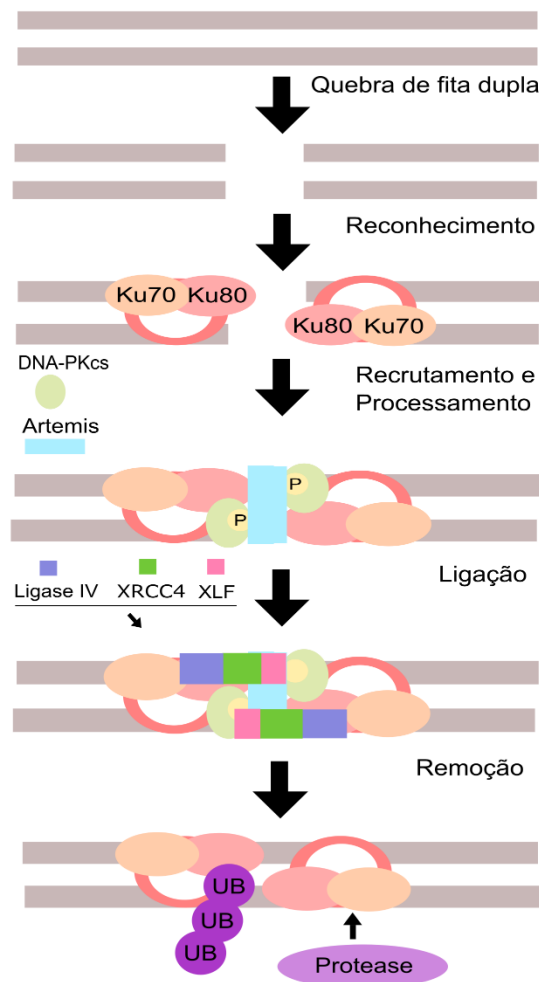


Figura 5. Esquema da via de recombinação não homóloga no reparo de quebras de fita dupla do DNA. O reconhecimento da quebra de fita dupla do DNA ocorre pelo heterodímero Ku, que recruta outras proteínas responsáveis pelo processamento das extremidades danificadas, produzindo extremidades compatíveis, as quais são unidas por atividade do complexo de ligação LigaseIV-XRCC4-XLF. Após o reparo, Ku é removido por protease e via de ubiquitinação. Figura baseada em (Fell & Schild-Poulter, 2015).

A proteína Ku age com efeito inibitório sobre as outras vias de reparo de quebras de fita dupla de DNA, uma vez que é a primeira proteína a se ligar nas extremidades de moléculas danificadas em qualquer estágio do ciclo celular. Além disso, sua superexpressão é capaz de reduzir o recrutamento de fatores da via de recombinação homóloga, mesmo quando esta seria a via de reparo preferencial (Clerici *et al.*, 2008). Dessa forma, as pesquisas de manipulações do genoma em fungos filamentosos, as quais são dependentes de eventos de recombinação homóloga, são muitas vezes tediosas e demoradas devido a recombinação não homóloga estar mais ativa, promovendo a integração ectópica no genoma fúngico (Krappmann, 2007).

1.6 Aumento da frequência de recombinação homóloga em fungos filamentosos

Duas abordagens são possíveis para aumentar a eficiência de recombinação homóloga em fungos filamentosos: aumentar as chances da ocorrência do mecanismo homólogo (Natsume *et al.*, 2004) ou prejudicar o mecanismo de recombinação não homólogo (Ninomiya *et al.*, 2004). Em *Aspergillus nidulans*, a superexpressão de um gene envolvido na recombinação homóloga resultou em um aumento na taxa de recombinação homóloga. No entanto, este gene superexpresso foi capaz de reprimir o crescimento deste fungo. Em *Neurospora crassa*, a deleção de genes da via de recombinação não homóloga foi capaz de aumentar a ocorrência de recombinação homóloga sem prejudicar o crescimento deste fungo nem ocasionar mudanças morfológicas. Isto sugere que a diminuição ou repressão de genes envolvidos na recombinação não homóloga pode ser a estratégia mais viável para aumentar a frequência de eventos de recombinação homóloga (Weld *et al.*, 2006).

O aumento da frequência de recombinação homóloga pela inativação dos genes *ku* tem sido reportado em diversos fungos e leveduras (Tabela 1). Em 2004, Ninomiya e colaboradores obtiveram 100% de recombinação homóloga ao construir linhagens $\Delta Ku70$ e $\Delta Ku80$ no fungo *Neurospora crassa*, sendo de 10 a 30 % a taxa de recombinação homóloga da linhagem selvagem. Este fungo com os genes *ku70* e *ku80* interrompidos não apresentou deficiência no crescimento nem mudanças morfológicas, mas aumentou moderadamente sua sensibilidade a alguns agentes mutagênicos, tais como metanossulfonato de metila, etilmetanosulfonato e

bleomicina. Em 2006, Nayak e colaboradores construíram uma linhagem Δ Ku70 em *Aspergillus nidulans* que apresenta cerca de 90 % de recombinação homóloga sem diferenças de crescimento entre a linhagem selvagem e a linhagem mutante. Este mutante não apresentou sensibilidade a mutagênicos, indicando que possui um sistema de reparo bastante eficiente.

Em 2008, uma linhagem Δ Ku70 de *Claviceps purpurea* aumentou a recombinação homóloga de 1-2 % para 50-60 % sem prejudicar a taxa de crescimento e germinação nem a patogenicidade deste fungo (Haarmann, Lorenz & Tudzynski, 2008). He e colaboradores em 2013 obtiveram linhagens Δ Ku70 e Δ Ku80 para *Monascus ruber* M7 com um aumento de 22,2 % e 31,5 % em eventos de recombinação homóloga para Ku70 e Ku80, respectivamente, sem diferenças significativas quando comparadas com a linhagem selvagem. Em *Metarhizium robertsii*, Xu e colaboradores (2014) conseguiram um aumento de 86 % na taxa de recombinação homóloga em um mutante para o gene *ku70* sem alterar a sensibilidade a estressores abióticos nem prejudicar sua patogenicidade. Em 2015, Qi e colaboradores construíram uma linhagem Δ Ku70 em *Verticillium dahliae* que foi capaz de aumentar a recombinação homóloga de 0,3 a 0,5 % para 22,8 a 34,7 % sem apresentar diferenças no crescimento e desenvolvimento quando comparada com a linhagem selvagem.

A deleção de *ku70* em *Penicillium digitatum* foi capaz de aumentar a recombinação homóloga de 0,6 % para 11,4 %. A linhagem mutante não apresentou alterações fenotípicas em relação ao crescimento, desenvolvimento, morfologia, patogenicidade e sensibilidade a alguns compostos, como H₂O₂, calcoflúor, SDS, NaCl, sorbitol ou fungicidas quando comparada com a selvagem. Entretanto, esta linhagem Δ Ku70 apresentou sensibilidade a temperaturas acima de 26 °C, sendo seu crescimento reduzido em 80 % quando inoculada a 28 °C, que corresponde à temperatura normal de crescimento deste fungo. Sendo assim, a temperatura ideal de crescimento foi entre 24 e 25 °C (Gandía *et al.*, 2016).

Tabela 1. Lista de fungos filamentosos que apresentaram aumento na taxa de recombinação homóloga pela metodologia de inativação de genes da via de recombinação não homóloga.

Organismo	Gene inativado	Recombinação Homóloga (%)	Referência
<i>Neurospora crassa</i>	<i>ku70/ku80</i>	100	Ninomiya <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>ku70</i>	75 - 95	Krappmann <i>et al.</i> (2006)
	<i>ku80</i>	80	Da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>ku70</i>	90	Nayak <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>ku70/ku80</i>	64.2 - 75	Takahashi <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus sojae</i>	<i>ku70/ku80</i>	63.4	Takahashi <i>et al.</i> (2006)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>ku70/ku80</i>	90 - 100	Goins <i>et al.</i> (2006)
<i>Sordaria macrospora</i>	<i>ku70</i>	85.7 - 100	Pöggeler & Kück (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>ku70</i>	>80	Meyer <i>et al.</i> (2007)
<i>Podospora anserina</i>	<i>ku70</i>	100	El-Khoury <i>et al.</i> (2008)
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>ku70/ku80</i>	37 - 100	Choquer <i>et al.</i> (2008)
<i>Claviceps purpurea</i>	<i>ku70</i>	50 - 60	Haarmann <i>et al.</i> (2008)
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>ku80</i>	>80	Villalba <i>et al.</i> (2008)
<i>Hypocrea jecorina</i>	<i>ku70</i>	>95	Guangtao <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>ku70</i>	60 - 69	Boer <i>et al.</i> (2010)
<i>Trichoderma virens</i>	<i>ku70</i>	88	Catalano <i>et al.</i> (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>ku70</i>	43	Verbeke <i>et al.</i> (2013)
<i>Monascus ruber</i>	<i>ku70/ku80</i>	22.2/31.5	He <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodospidium torulooides</i>	<i>ku70</i>	75.3	Koh <i>et al.</i> (2014)
<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>ku70</i>	86	Xu <i>et al.</i> (2014)
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>ku70</i>	22.8 - 34.7	Qi <i>et al.</i> (2015)
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>ku70</i>	11.4	Gandia <i>et al.</i> (2016)

Devido ao aumento nos eventos de recombinação homóloga, fungos deficientes para a via de recombinação não homóloga são úteis em estudos funcionais, uma vez que facilitam a obtenção de mutantes. No entanto, em alguns casos, não somente diminuem ou inibem a recombinação não homóloga, como podem reduzir a capacidade de reparo. Dessa forma, mesmo que sejam similares morfológicamente à linhagem selvagem, podem apresentar sensibilidade a alguns compostos mutagênicos (Kück & Hoff, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir mutantes de *Metarhizium anisopliae* para o gene *ku70*, que apresentem maior taxa de recombinação homóloga. Estas linhagens serão utilizadas na montagem de um sistema mais eficiente para a geração de mutantes funcionais para genes alvo neste fungo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Interromper o *locus* do gene *ku70* de *M. anisopliae* pela construção de um vetor de deleção contendo uma marca de seleção flanqueada por regiões do gene *ku70* e posterior transformação do fungo mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Seleção dos transformantes em meio seletivo sob pressão seletiva da marca de resistência inserida no *cassette* de inativação.

b. Avaliar a sensibilidade dos mutantes a estressores abióticos.

c. Comprovar o aumento da eficiência de recombinação homóloga por meio da construção do mutante $\Delta D1$ de *M. anisopliae*, que consiste em um mutante nulo para o gene *chimaD1*, o qual codifica uma quitinase neste organismo.

d. Analisar a eficiência de infecção dos mutantes por bioensaio com *Ulomoides dermestoides*.

3. JUSTIFICATIVA

A caracterização da função gênica pela construção de mutantes nulos é uma das abordagens mais utilizadas em estudos realizados em *Metarhizium anisopliae* para melhor compreendermos o processo de infecção e suas interações com o hospedeiro, sendo realizada a partir da interrupção do *locus* de interesse via recombinação homóloga. No entanto, a geração de mutantes nulos por recombinação homóloga exibe baixa eficiência em fungos filamentosos, tornando necessária a utilização de abordagens que aumentem a taxa de recombinação homóloga. Este estudo facilitará a obtenção de mutantes nulos para genes alvo em *M. anisopliae* a partir de um mutante Ku70 para a via de recombinação não homóloga.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens

A linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae* utilizada neste trabalho foi originalmente isolada de *Deois flavopicta* no estado do Espírito Santo, Brasil, cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo da coleção da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

A linhagem de *Escherichia coli* TOP10 foi utilizada para as manipulações de DNA de acordo com procedimentos padrão (Sambrook & Russell, 2001).

A linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foi utilizada na agrotransformação, juntamente com o vetor binário pPZP201BK. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência. Para etapas intermediárias, foi utilizado o vetor pCR2.1TOPO (*Invitrogen*).

4.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados na manutenção de *M. anisopliae* foram: Meio de Cove (MC) [nitrato de sódio 0,6 %, glicose 1 %, pH 6,0] e Meio de Cove Completo (MCc) [nitrato de sódio 0,6 %, glicose 1 %, peptona 0,2 %, extrato de levedura 0,05%, caseína hidrolisada 0,15 %, pH 6,0]. São ainda acrescidos: 2 % de Solução de Sais [KCl 2,6 %, MgSO₄.7H₂O 2,6 %, KH₂PO₄ 7,6 % (m/v)] e 0,04 % de Elementos Traços [Na₂B₄O₇.7H₂O 0,004 %, CuSO₄.5H₂O 0,04 %, FeSO₄ 0,0001 %, MnSO₄ 0,08 %, Na₂Mo₄.2H₂O 0,08 %, ZnSO₄.7H₂O 0,08 % (m/v)] e, quando necessário, foi adicionado 1,5 % de ágar. *M. anisopliae* é inoculado a 28 °C até esporulação (7 a 10 dias).

E. coli foi cultivada em Meio Luria-Bertani (LB) e, quando necessário, foi adicionado 1,5 % de ágar, e em Meio SOC [triptona 1%, extrato de levedura 5%, NaCl 1% e glicose 20 mM] após transformação por choque térmico. Os meios são mantidos a 37 °C.

4.3 Soluções e Enzimas Utilizadas

As soluções foram preparadas de acordo com Sambrook & Russell (2001), utilizando água destilada ou Milli-Q autoclavadas. As enzimas de restrição e de modificação foram obtidas a partir da *Promega* e *Thermo Scientific*.

4.4 Construção do *cassette* de inativação do gene *Ku70*

Foi construído um *cassette* de inativação para interromper o *locus* do gene *ku70* da linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae*. Para isso, as regiões de aproximadamente 1.200 pb a montante e a jusante da região codificadora do gene *ku70* e o *cassette* para expressão do gene *nat*, o qual confere resistência ao antibiótico nourseotricina, foram amplificadas utilizando *primers* específicos (Tabela 2). Os *amplicons* obtidos foram fusionados através da tecnologia de *double-joint* PCR (Yu *et al.*, 2004), sendo o *cassette* de deleção amplificado com os *primers* *Nested* (Figura 6).

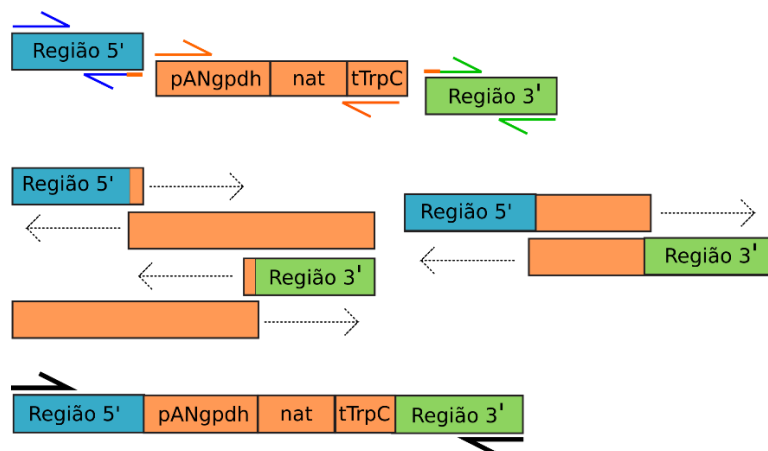


Figura 6. Representação esquemática das etapas de construção do *cassette* de deleção do gene *ku70*. Através da reação de fusão, os fragmentos de DNA da região 5' e 3' do gene *ku70* (em azul e verde, respectivamente) e o *cassette* de expressão da marca de resistência *nat* (que confere resistência a nourseotricina), sob controle do promotor pANgpdh e do terminador tTrpC (em laranja), foram fusionados e essa construção fusionada foi amplificada utilizando os *primers* *Nested* (setas pretas).

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados para construção do *cassette* deleção de *ku70*

<i>Primer</i>	Sequência (5'- 3')	Descrição
KU70_5_FOR	CCCAGACTGAGCTGGCCA TC	Amplificação da região 5' flanqueadora da região codificadora do gene <i>ku70</i>
KU70_5_REV	TGCCAGAAAGAGTACCGGTCCTGTACAGTAT TAAGTCAATTTTGTTTA	
KU70_3_FOR	TGTACTIONTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCGGCTGTAC TTGGGACTGTGC	Amplificação da região 3' flanqueadora da região codificadora do gene <i>ku70</i>
KU70_3_REV	ACCTAGTAAATCAAGTTAGA	
NATpTEF_FOR	TCTAATACCTTCAAATGGCGGCCGCCACT	Amplificação da porção codificadora do gene <i>nat</i>
NATTrpC_REV	GTAACGTTAAGTGGATTATGGACAAGGCAT	
KU70_NEST_FOR	CGGTACCCGGGGATCCCCACCCTCTTTCCTT	Construção do <i>cassette</i> de deleção do gene <i>ku70</i>
KU70_NEST_REV	CGACTCTAGAGGATCCCATTAAGACCGGATC	

4.5 Clonagem do *cassette* Δ Ku70 no vetor pPZP201BK e Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

O *cassette* de deleção foi clonado no vetor de entrada pCR-2.1-TOPO de acordo com protocolo do fabricante, a fim de obter maior quantidade e eficiência de transformação. 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 de restrição *Bam*HI e *X*Bal. Seguidamente, o *cassette* foi clonado no plasmídeo pPZP201BK próprio para agrotransformação, entre as bordas direita e esquerda, construindo assim o vetor pPZP:: Δ Ku70::nat. A construção deste vetor foi confirmada através da digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *X*bal, as quais liberam o *cassette* de aproximadamente 4.200 pb, bem como PCR amplificando tanto a região 5' quanto a região 3' do gene *ku70*, as quais estão flanqueando a marca de resistência no *cassette* de deleção, utilizando os *primers* KU70_NEST_FOR e KU70_5_REV (Tabela 2) para amplificar a região 5' de aproximadamente 1.200 pb e os *primers* KU70_3_FOR e KU70_NEST_REV (Tabela 2) para amplificar a região 3' de aproximadamente 1.200pb.

Células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* foram transformadas com o vetor pPZP:: Δ Ku70::nat e, posteriormente, utilizadas na agrotransformação de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido (Staats *et al.*, 2007).

4.6 Seleção dos transformantes e confirmação dos mutantes

Os transformantes que se desenvolveram em meio seletivo contendo nourseotricina foram isolados. A seleção dos transformantes foi previamente realizada pela extração de DNA dos esporos em micro-ondas (Ferreira & Glass, 1996) e análise por PCR negativa, amplificando uma região interna do gene *ku70* utilizando os *primers* KU70int_1F e KU70int_1R (Tabela 3). Esta região deverá estar ausente caso a recombinação homóloga tenha ocorrido com eficiência, sendo este processo repetido três vezes para cada possível mutante. Após esta primeira seleção, foi efetuado cultivo em meio líquido seletivo (MC + nourseotricina) dos transformantes obtidos para proceder à extração de DNA genômico e uma segunda confirmação dos mutantes foi realizada por análise da integração utilizando *Southern blot*.

Tabela 3. Lista de *primers* utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do *cassette* de deleção do gene *ku70* no genoma fúngico

<i>Primers</i>	Sequência (5'- 3')	Descrição
KU70int_1F	GGGGATCAAGAGATTGACGA	Amplificação de uma região interna do gene <i>ku70</i>
KU70int_1R	GAAGAGCACGTTTCGACATGA	Amplificação de uma região interna do gene <i>ku70</i>

4.7 Análise fenotípica dos mutantes

4.7.1 Tolerância a estressores abióticos

Os mutantes de *ku70* confirmados por análise de integração com a correta recombinação homóloga foram submetidos a testes comparando-os com a linhagem selvagem. Estes testes consistem na exposição a estressores, incluindo estresse osmótico (1M NaCl, 1M KCl, 0,6 M CaCl₂), estresse oxidativo (40 mM H₂O₂) e

estressores da integridade da parede celular (450 µg/mL Congo Red e 50 µg/mL Calcoflúor) a fim de analisar se a sensibilidade dos mutantes a estes compostos é afetada. Para isso, 10^4 , 10^3 e 10^2 conídios das linhagens mutantes e selvagem foram plaqueados em meio de cultivo MC suplementado com cada estressor e cultivados a 28 °C, sendo analisados visualmente após 7 dias.

4.8 Construção do mutante Δ D1 de *M. anisopliae* utilizando o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1

4.8.1 Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

Para avaliar se a taxa de recombinação homóloga das linhagens Δ Ku70 de *M. anisopliae* obtidas são maiores que da linhagem E6, foram construídos mutantes nulos para o gene *chimaD1*, que codifica a quitinase ChiMaD1. Para isso, o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1 previamente construído pelo grupo de pesquisa foi utilizado na transformação de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* e, posteriormente, utilizadas na agrotransformação de 5 linhagens Δ Ku70 (T1, T2, T4, T5 e T6) de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido (Staats *et al.*, 2007).

4.8.2 Seleção dos transformantes e confirmação dos mutantes

Os transformantes que se desenvolveram em meio seletivo contendo glifosinato de amônio foram isolados. A seleção dos transformantes foi previamente realizada pela extração de DNA dos esporos em micro-ondas (Ferreira & Glass, 1996) e análise por PCR negativa, amplificando o gene *chimaD1* utilizando os *primers* D1_5For e D1_3Rev (Tabela 4). Este gene deverá estar ausente caso a recombinação homóloga tenha ocorrido com eficiência, sendo este processo repetido duas vezes para cada possível mutante.

Tabela 4. Lista de *primers* utilizados para seleção dos transformantes com a inserção do *cassette* de deleção do gene *chimaD1* no genoma fúngico

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Descrição
D1_5FOR	GTACCATTTTCAGAGTTATCA	Amplificação da região 5' flanqueadora da região codificadora do gene <i>chimaD1</i>
D1_3REV	GGCCAGGAAATAGCACCGGA	Amplificação da região 3' flanqueadora da região codificadora do gene <i>chimaD1</i>

4.9 Bioensaio com *Ulomoides dermestoides*

Para avaliar se a eficiência de infecção dos mutantes Δ Ku70 é afetada, foi realizado bioensaio utilizando como hospedeiro *Ulomoides dermestoides*. Neste experimento, 10 insetos adultos foram infectados com 10^8 esporos/mL da linhagem selvagem e da linhagem T4 do mutante Δ Ku70 conforme protocolo previamente estabelecido (Boldo *et al.*, 2009). Foram realizadas triplicatas biológicas e os dados foram analisados por ANOVA duas vias utilizando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, SanDiego, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do *cassette* de deleção do gene *ku70*

Foi realizada a amplificação de regiões de 1.200 pb a montante e a jusante da região codificadora do gene *ku70* e do *cassette* de expressão do gene *nat* (Descrito em 4.4). A utilização da tecnologia de *double-joint* PCR (Yu *et al.*, 2004) foi eficaz para fusionar os produtos amplificados separadamente, e resultou na obtenção do *cassette* de deleção de aproximadamente 4.190 pb, que foi amplificado com os *primers* Nested, os quais flanqueiam toda a região de deleção do gene *ku70* (Figura 7).

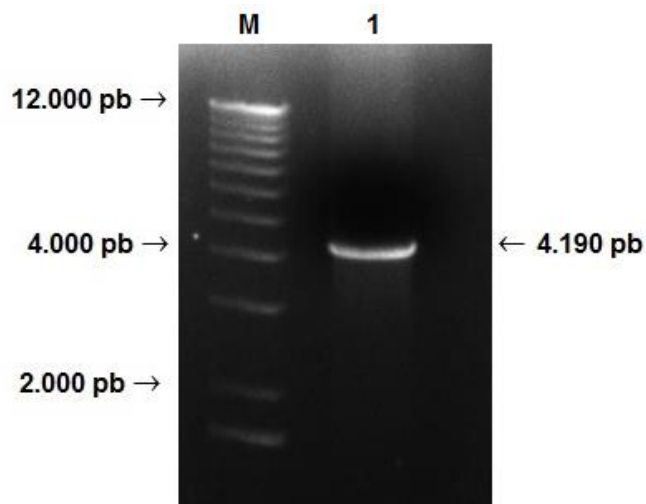


Figura 7. Amplificação do *cassette* de deleção do gene *ku70*. Amplificação da fusão das regiões a montante e a jusante do gene *ku70* fusionadas ao *cassette* de expressão de *nat* utilizando os *primers* Nested. M- marcador 1Kb *Plus DNA Ladder*, 1 – regiões de interesse amplificadas.

5.2 Construção do vetor pPZP:: Δ Ku70::nat

5.2.1 Clonagem do *cassette* Δ Ku70 no vetor pPZP201BK

Para a construção do vetor pPZP:: Δ Ku70::nat, houve duas etapas de clonagem do *cassette* de deleção devido à dificuldade de manipulação do vetor binário. Além disso, a etapa de clonagem prévia possibilita a obtenção de um maior número de cópias do *cassette*. Na primeira etapa, o *cassette* foi clonado no vetor pCR-2.1-TOPO (Figura 8). O DNA plasmidial foi extraído e digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I,

liberando o *cassette* $\Delta ku70$ de 4.284 pb.

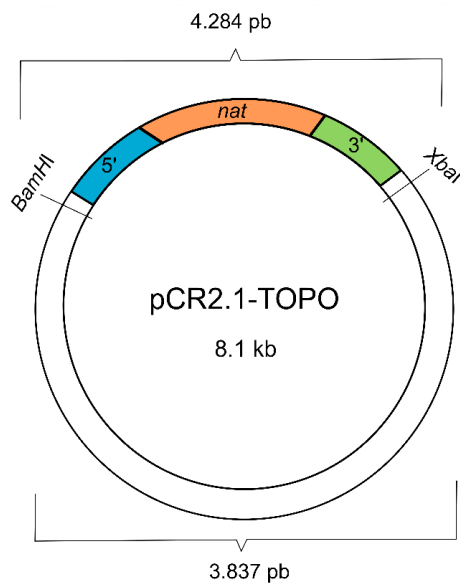


Figura 8. Representação esquemática da clonagem do *cassette* de deleção do gene *ku70* no vetor pCR-2.1-TOPO. Estão apresentados na figura os sítios das enzimas de restrição utilizadas para liberação da construção e os tamanhos moleculares esperados para os produtos da digestão.

Na segunda etapa de clonagem, o *cassette* foi subclonado no vetor pPZP201BK, construindo o vetor pPZP:: $\Delta Ku70$::*nat* (Figura 9).

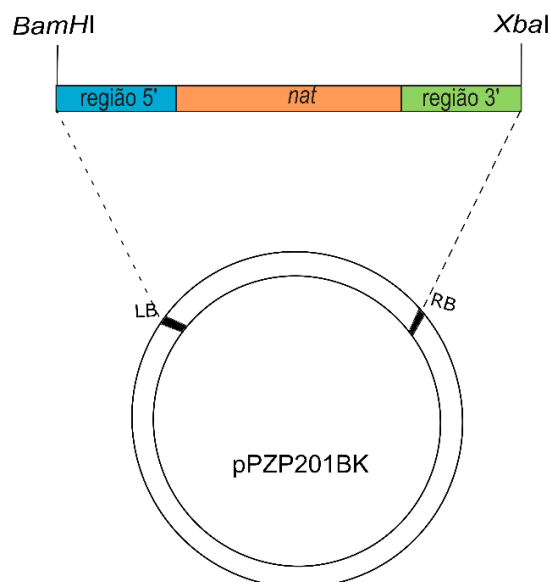
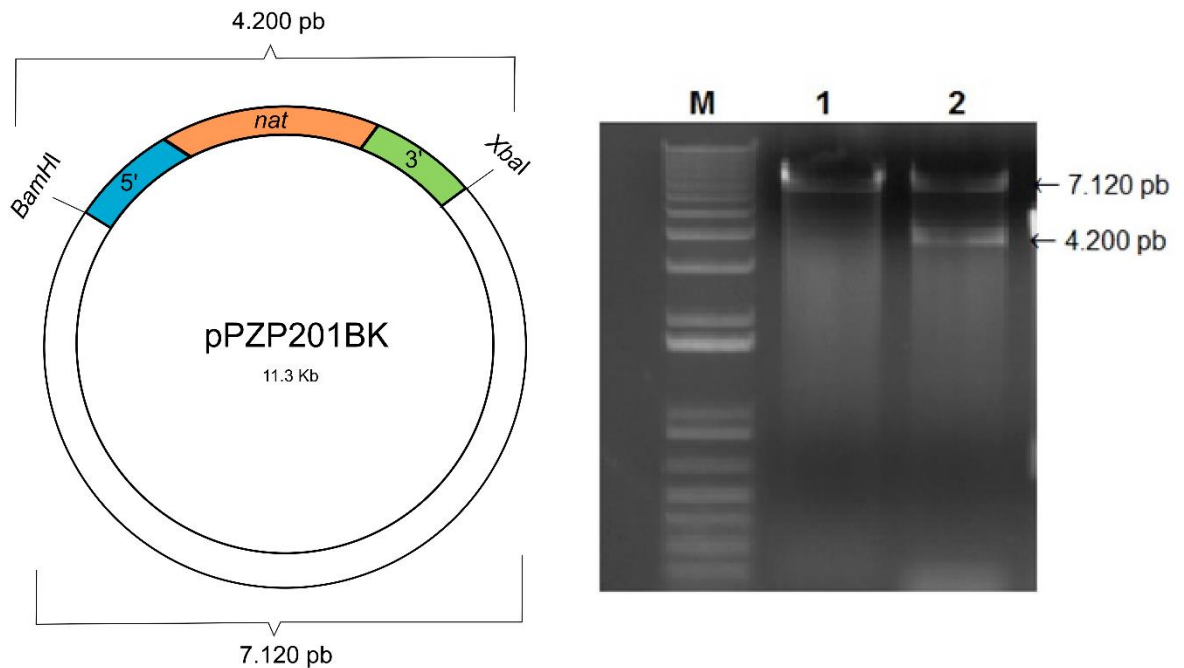


Figura 9. Representação esquemática da construção do vetor pPZP:: $\Delta ku70$::*nat*. O plasmídeo pPZP201BK foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI* para posterior clonagem do *cassette* $\Delta ku70$. Bordas LB e RB do T-DNA – Regiões que vão servir para a transferência do T-DNA para a célula hospedeira.

5.2.2 Confirmação da construção

O vetor pPZP:: Δ Ku70::nat foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I liberando o *cassette* de deleção. Esta reação de clivagem confirma a inserção do *cassette* de deleção Δ Ku70 no vetor pPZP201BK pela obtenção da banda de 4.200 pb, correspondente ao *cassette* de deleção, e da banda de 7.200 pb, correspondente ao vetor pPZP201BK (Figura 10A). Além disso, a construção foi confirmada por reações de PCR amplificando as regiões 5' e 3' do gene *ku70* de 1.200 pb, as quais flanqueiam o gene *nat* no *cassette* de deleção (Figura 10B).

(A)



(B)

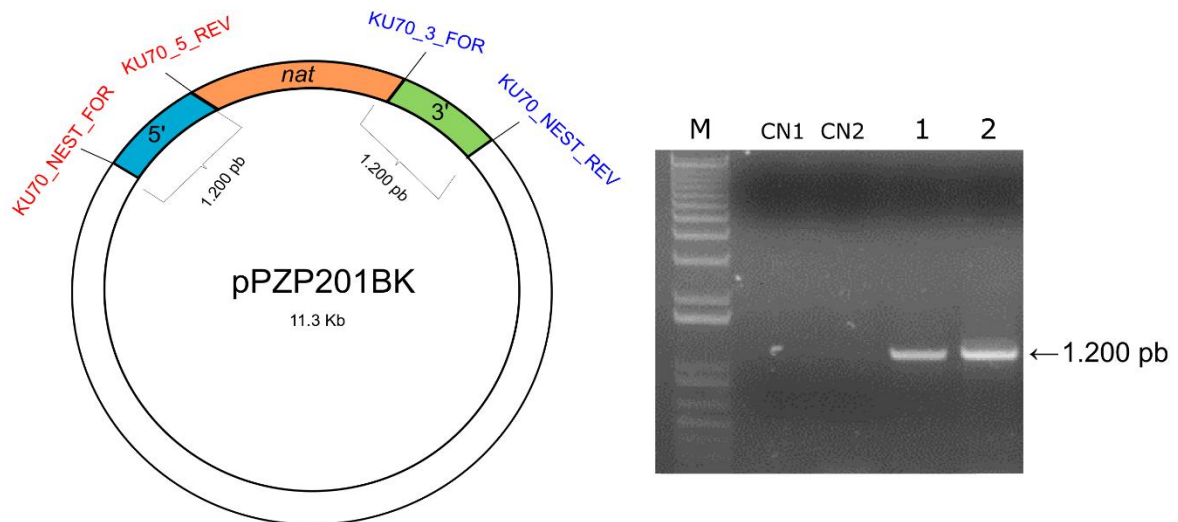


Figura 10. Confirmação da clonagem do cassette de deleção $\Delta ku70$ no vetor pPZP201BK. (A) Clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I. M= marcador 1 kb *plus DNA ladder*, 1= pPZP201BK, como controle da reação 2= amostra de DNA plasmidial com liberação do *cassette* de deleção (4.200 pb) e do vetor pPZP201BK (7.120 pb). (B) Confirmação da construção por PCR. M= marcador 1 kb *plus DNA ladder*, CN1= Controle negativo da reação 1; CN2= Controle negativo da reação 2; 1= Amplificação da região 5' (1.200 pb) com os *primers* KU70_NEST_FOR e KU70_5_REV (representados em vermelho); 2= Amplificação da região 3' (1.200 pb) com os *primers* KU70_3_FOR e KU70_NEST_REV (representados em azul).

5.3 Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e seleção dos transformantes

A agrotransformação de *M. anisopliae* resultou em 385 transformantes que cresceram em *top* Ágar contendo nourseotricina. Esses foram isolados em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de seleção com 1,5% de ágar. A seleção dos transformantes contendo a correta recombinação homóloga foi realizada através da técnica de PCR, utilizando DNA de esporos como molde da reação e *primers* que amplificam uma região interna de aproximadamente 500 pb do gene *ku70* (Tabela 3). Quando não há amplificação desta região, há indícios de que tenha ocorrido recombinação homóloga, interrompendo o *locus* alvo. Estes transformantes são selecionados e submetidos a esta técnica por mais duas vezes para confirmar a possível recombinação homóloga, uma vez que a extração de DNA de esporos realizada por micro-ondas pode conter DNases, que degradam DNA ou debris

celulares que podem inibir a reação de PCR. Dos 385 transformantes obtidos, 6 não apresentaram a amplificação de 500 pb, sugerindo a ocorrência de recombinação homóloga, interrompendo o *locus* do gene *ku70* (Figura 11).

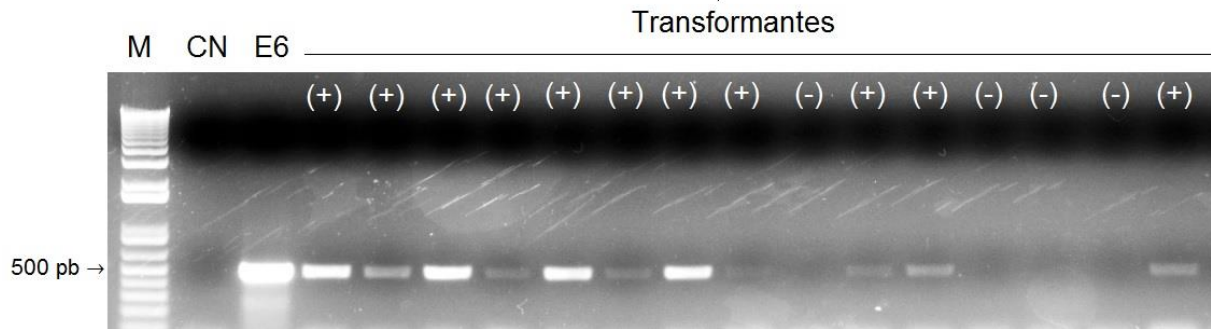


Figura 11. Screening dos transformantes obtidos a partir da agrotransformação de *M. anisopliae* com plasmídeo pPZP:: Δ Ku70::nat. Representação de quinze transformantes. M= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*; CN= controle negativo; E6= DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae* (controle positivo) com aproximadamente 500 pb; Transformantes= transformantes testados pela PCR com os *primers* KU70int_1F e KU70int_1R; (-)= ausência da amplificação de 500 pb (possível recombinação homóloga).

5.4 Confirmação dos mutantes

Os seis transformantes selecionados por PCR (Descrito em 5.3) foram cultivados em meio líquido seletivo, contendo nourseotricina, e submetidos à extração de DNA genômico e uma segunda confirmação dos mutantes foi realizada por análise da integração utilizando *Southern blot*. A sonda utilizada foi obtida a partir da amplificação da região 3' do gene *ku70*. Este fragmento amplificado foi purificado e digerido com a enzima *NcoI*, resultando em um fragmento de aproximadamente 900pb (Figura 12).

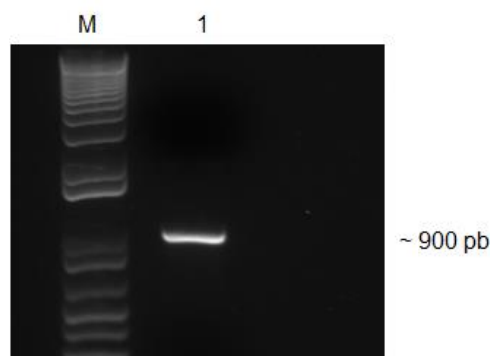


Figura 12. Purificação da sonda utilizada no *Southern blot* para confirmação dos mutantes Δ ku70 de *M. anisopliae*. M= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*; 1= sonda de hibridização de aproximadamente 900 pb.

Para a técnica de *Southern blot*, o DNA da linhagem selvagem e da linhagem Δ Ku70 foram digeridos com as enzimas *EcoRV* e *NcoI*. Esta técnica distingue estas linhagens através da banda de hibridização gerada entre os fragmentos de DNA e a sonda utilizada. A hibridização na linhagem selvagem resulta em uma banda de 2.560 pb enquanto na linhagem Δ ku70 é de 1.560 pb (Figura 13).

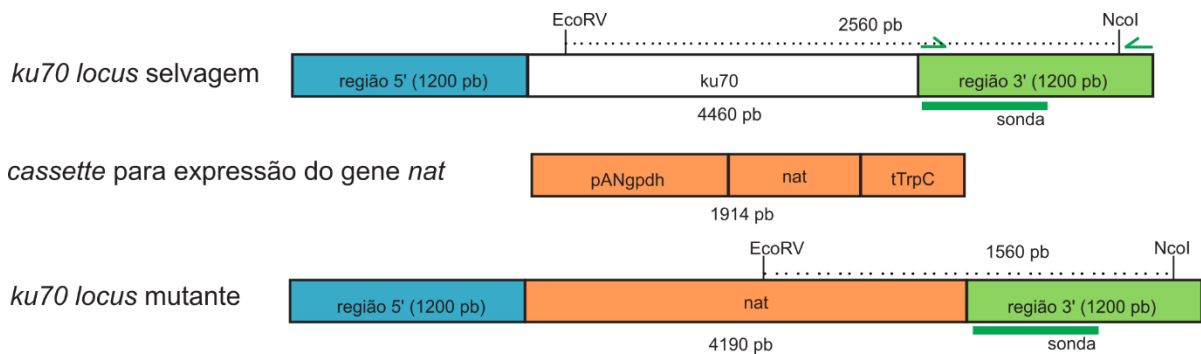


Figura 13. Representação da hibridização entre o DNA da linhagem selvagem e Δ ku70 digeridos com as enzimas *EcoRV* e *NcoI* e a sonda utilizada no *Southern blot*.

Com a análise de integração, foi possível confirmar a obtenção dos seis mutantes previamente selecionados, uma vez que todos apresentaram uma banda de hibridização de 1.560 pb (Figura 14).

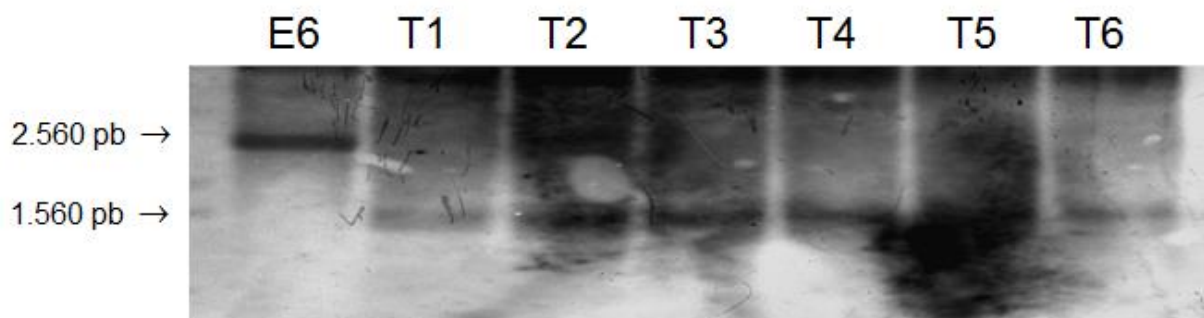


Figura 14. Confirmação dos transformantes por *Southern blot*. E6= linhagem selvagem de *M. anisopliae*, com hibridização em 2.560 pb. T1-T6= mutantes com o locus do gene *ku70* interrompido, com hibridização em 1.560 pb.

5.5 Análise fenotípica: Tolerância dos mutantes a estressores abióticos

As linhagens Δ Ku70 obtidas foram comparadas com a linhagem selvagem em relação a sua capacidade de crescimento em presença de estressores abióticos, a partir do cultivo em meio contendo NaCl, KCl, CaCl₂, H₂O₂, Congo Red e Calcoflúor. As linhagens Δ Ku70 não diferem fenotipicamente da linhagem selvagem e não apresentaram uma maior sensibilidade a estes compostos, possuindo uma taxa de crescimento similar à da linhagem E6 de *M. anisopliae*. Este resultado é o desejado pois as linhagens Δ Ku70 serão utilizadas na construção de mutantes funcionais em *M. anisopliae*, e uma alteração morfológica poderia interferir nos estudos de função gênica posteriores. Além disso, é possível observar que este fungo apresenta uma sensibilidade maior a estresse osmótico quando comparado a estresse oxidativo ou perturbação na integridade da parede celular, uma vez que em presença de NaCl, KCl e CaCl₂ apresentou crescimento reduzido em comparação ao crescimento na presença de H₂O₂, Calcoflúor e Congo Red (Figura 15).

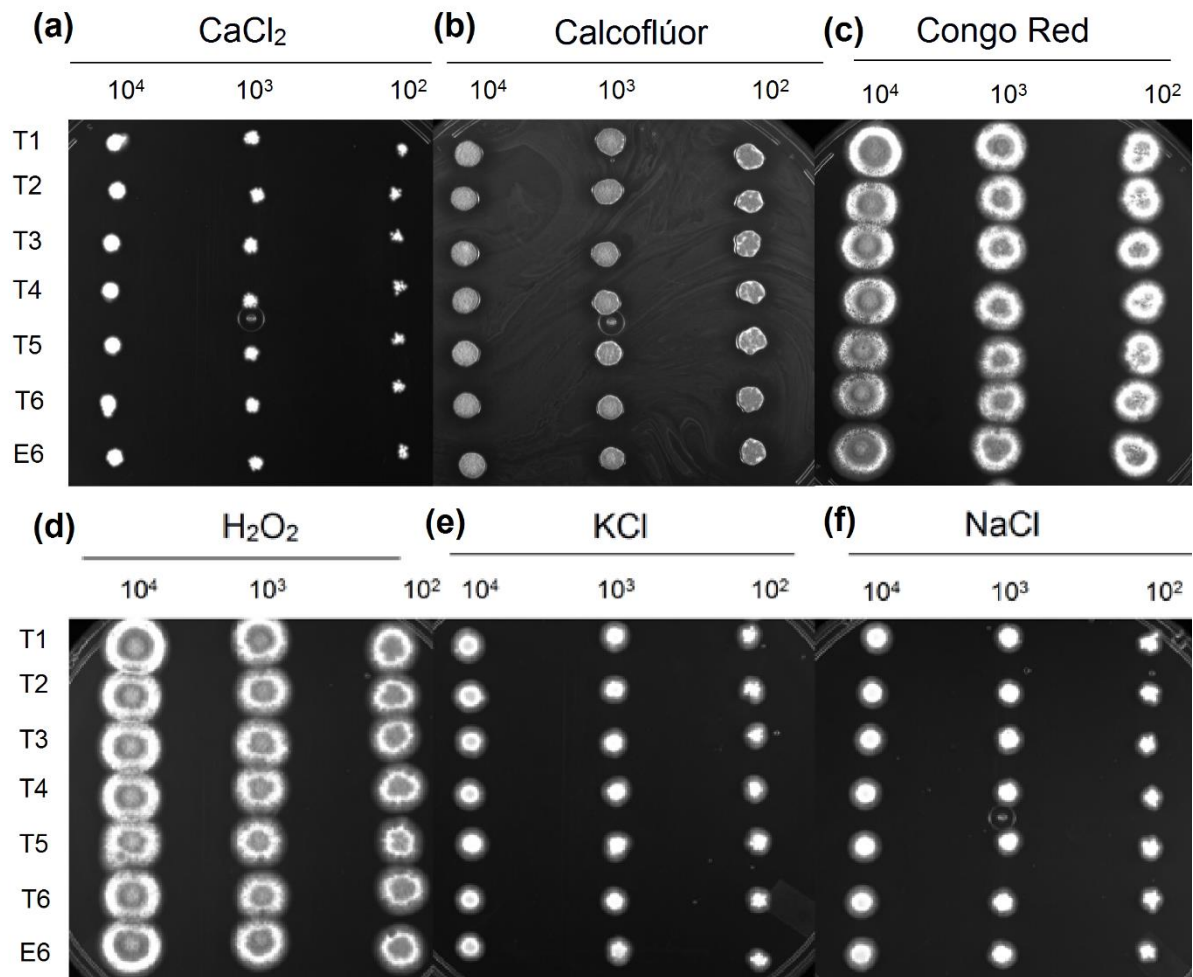


Figura 15. Tolerância dos mutantes a estressores abióticos. 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos cultivados a $28^\circ C$ durante 7 dias em Meio de Cove acrescido de 2% de soluções de sais, 0,04% de elementos traços e estressores: (a) 0,6 M $CaCl_2$, (b) 50 $\mu g/mL$ Calcoflúor, (c) 450 $\mu g/mL$ Congo Red, (d) 40 mM H_2O_2 , (e) 1M KCl, (f) 1M NaCl. E6 = linhagem selvagem, T1-T6= mutantes com o locus do gene *ku70* interrompido.

5.6 Construção do mutante $\Delta D1$ de *M. anisopliae* utilizando o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1

Para avaliar se a taxa de recombinação homóloga das linhagens $\Delta Ku70$ de *M. anisopliae* obtidas são maiores que da linhagem E6, a qual é inferior a 1%, foram construídos mutantes nulos para o gene *chimaD1*, que codifica a quitinase ChiMaD1, utilizando 5 linhagens $\Delta Ku70$ (T1, T2, T4, T5 e T6). Para isso, o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1 previamente construído pelo grupo de pesquisa foi utilizado na transformação de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* e, posteriormente, utilizadas na agrotransformação de *M. anisopliae* $\Delta Ku70$ T1, T2, T4, T5 e T6. Este vetor apresenta um *cassette* de deleção para o gene *chimaD1*, em que

a marca de resistência (gene *bar*, que confere resistência ao glifosinato de amônio) está flanqueada por sequências homólogas às sequências adjacentes do *locus* alvo (regiões 5' e 3' do gene *chimaD1*). Portanto, os transformantes que se desenvolveram em meio seletivo contendo glifosinato de amônio foram isolados. Desse isolamento, foram obtidos 17 transformantes de T1, 16 de T2, 16 de T4, 12 de T5 e 16 de T6. Os transformantes obtidos de T5 não mantiveram a taxa de crescimento normal quando isolados, tendo uma taxa de crescimento reduzida quando comparada aos outros transformantes, sendo descartados desta análise. A seleção dos transformantes foi realizada pela extração de DNA dos esporos em micro-ondas e análise por PCR negativa, amplificando o gene *chimaD1* de aproximadamente 1.000 pb utilizando *primers* específicos (Tabela 4). Este gene deverá estar ausente caso a recombinação homóloga tenha ocorrido com eficiência. A partir desta análise, pode-se observar que o mutante T1 exibiu uma taxa de recombinação homóloga aumentada em relação ao tipo selvagem de 23,53 %, o T2 exibiu uma taxa de 12,5 %, o T4 37,5 % e o T6 25 %. A partir destes dados, o mutante T4 foi selecionado para uma segunda etapa de PCR negativo a fim de confirmar sua taxa de recombinação homóloga, utilizando como molde de reação o DNA dos transformantes que não obtiveram a banda de 1.000 pb na primeira etapa de seleção, pois estes indicam prováveis mutantes para o gene *chimaD1*. Nenhum dos 6 transformantes apresentou a banda de 1.000 pb, indicando a ocorrência de recombinação homóloga, interrompendo o gene *chimaD1* (Figura 16).

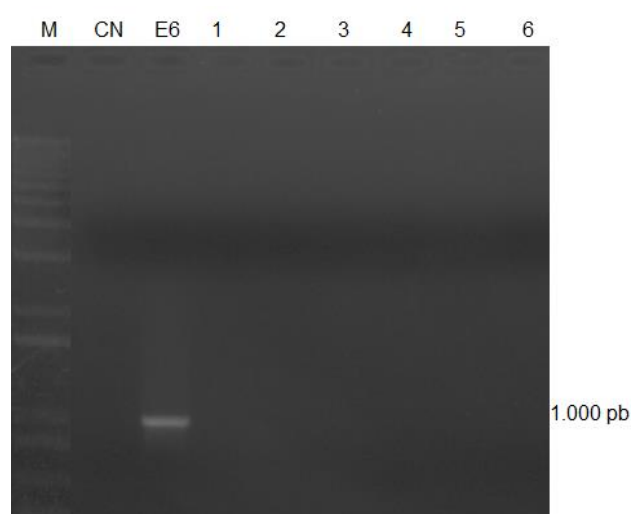


Figura 16. Screening dos transformantes obtidos a partir da agrotransformação de *M. anisopliae* Δ Ku70 T4 com plasmídeo pPZP201BK- Δ ChimaD1. Representação de seis transformantes. M= marcador 1 Kb *Plus DNA ladder*; CN= controle negativo; E6= DNA da linhagem E6 de *M. anisopliae* (controle positivo) com aproximadamente 1.000 pb; 1-6= transformantes testados pela PCR, sendo a ausência da amplificação de 1.000 pb um indício de possível recombinação homóloga.

Esta análise indica que o transformante T4 possui uma taxa de recombinação mais alta e, portanto, será utilizado nos experimentos seguintes. Além disso, foi possível analisar que a linhagem Δ Ku70 de *M. anisopliae* apresenta uma taxa de recombinação homóloga de aproximadamente 40 %.

A deleção de Ku já foi realizada em mais de 20 espécies de fungos filamentosos (Tabela 1), resultando sempre em um aumento na frequência de recombinação homóloga, mostrando-se uma estratégia eficiente para a geração de mutantes para estudos funcionais. No entanto, este aumento na taxa de recombinação homóloga depende da espécie e do gene alvo, promovendo variações nos resultados obtidos entre as espécies de fungos filamentosos estudadas (Kück & Hoff, 2010). A taxa de recombinação homóloga obtida no mutante Δ ku70 de *Metarhizium anisopliae* para a deleção do gene *chimaD1* demonstra a eficiência deste mutante em facilitar a obtenção de mutantes funcionais neste organismo.

5.7 Bioensaio com *Ulomoides dermestoides*

A eficiência de infecção do mutante Δ Ku70 de *M. anisopliae* foi comparada com a da linhagem selvagem por bioensaio com *Ulomoides dermestoides*. A partir da curva de sobrevivência (Figura 17), é possível observar que o controle não infectado mantém a taxa de sobrevivência em aproximadamente 100 % ao longo dos 15 dias de infecção, sendo que após 4 dias de infecção a linhagem selvagem e mutante diferem do controle, mas não diferem entre si em nenhum dos tempos analisados, mesmo após 15 dias de infecção. Portanto, a linhagem Δ Ku70 de *M. anisopliae* não reduz sua capacidade de infecção, como já observado em outras espécies, tais como *Botrytis cinerea* (Choquer *et al.* 2008), *Claviceps purpurea* (Haarmann *et al.* 2008), *Metarhizium robertsii* (Xu *et al.* 2014), entre outras.

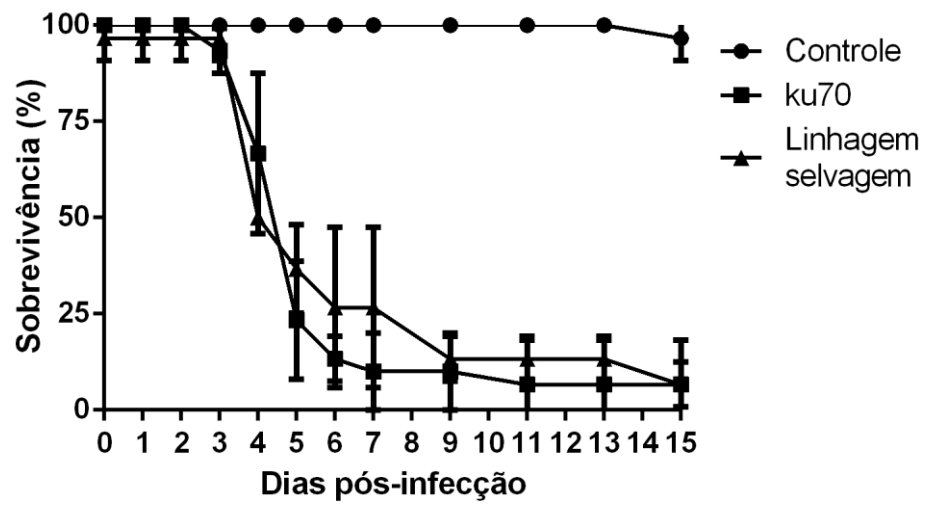


Figura 17. Bioensaio. Eficiência de infecção de *M. anisopliae* E6 e Δ Ku70 em *Ulomoides dermestoides*. As barras representam desvio padrão.

6. CONCLUSÕES

Com a finalidade de obtermos linhagens de *Metarhizium anisopliae* com uma maior taxa de recombinação homóloga para serem construídos mutantes funcionais com uma maior eficiência, foi construído um mutante para o gene *ku70*, que atua na via de recombinação não homóloga. Para isso, foi construído um *cassette* de deleção para o gene *ku70*, o qual foi clonado no vetor binário pPZP201BK, construindo o vetor pPZP:: Δ Ku70::nat. Este vetor foi utilizado na transformação de *M. anisopliae* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Desta transformação, foram obtidos 385 mutantes, sendo que seis possuíam o *locus* do gene *ku70* interrompido, os quais foram selecionados por PCR e confirmados por *Southern blot*. Estes mutantes foram submetidos a teste de tolerância a estressores abióticos a fim de avaliar se a sensibilidade a estes compostos foi alterada. A partir deste teste foi possível verificar que a taxa de crescimento e morfologia são similares a da linhagem selvagem. Além disso, para confirmar o aumento da recombinação homóloga, cinco mutantes foram utilizados na construção de um mutante nulo para o gene *chimaD1*, que codifica uma quitinase. Esta análise indica que a taxa de recombinação homóloga aumentou de 1 % na linhagem selvagem para aproximadamente 40 % na linhagem Δ ku70, demonstrando a eficiência deste mutante em facilitar a obtenção de mutantes funcionais neste organismo. Além disso, este mutante não reduz sua eficiência de infecção em *Ulomoides dermestoides* quando comparada com a da linhagem selvagem.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar se os mutantes Δ Ku70 são mais suscetíveis a mutações por exposição a mutagêncios, como a radiação UV.
- Analisar fenotipicamente os mutantes selecionados pela formação de apressório e blastosporo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, W. *et al.* (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol*, v. 37, n. 3-4, p. 231-44. ISSN 0168-8162.
- BARATTO, C. M. *et al.* (2006) Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase chi2 Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol*, v. 53, n. 3, p. 217-21. ISSN 0343-8651.
- BARRETO, C. C. *et al.* (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol*, v. 48, n. 2, p. 102-7. ISSN 0343-8651.
- BEYS DA SILVA, W. O. *et al.* (2010) *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal Biol*, v. 114, n. 1, p. 10-5. ISSN 1878-6146.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, v. 101, n. 4, p. 512-30. ISSN 0027-5514.
- BOGO, M. R. *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*, v. 37, n. 4, p. 221-5. ISSN 0343-8651.
- BOLDO, J. T. *et al.* (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet*, v. 55, n. 5, p. 551-60. ISSN 1432-0983.

- CANNAVO, E.; CEJKA, P. (2014) Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, v. 514, n. 7520, p. 122-5. ISSN 1476-4687.
- CATALANO, V. *et al.* (2011) Use of a non-homologous end-joining-deficient strain (Δ -ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Curr Genet*, v. 57, n. 1, p. 13-23. ISSN 1432-0983.
- CEJKA, P. (2015) DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination. *J Biol Chem*, v. 290, n. 38, p. 22931-8. ISSN 1083-351X.
- CHARNLEY, A. K. (1991) Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology* 12(5), 149-157.
- CHOQUER M, Robin G, Le Pecheur P, Giraud C, Levis C, Viaud M (2008) Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wildtype context. *FEMS Microbiol Lett* 289:225–232
- CLARKSON, J. M., & Charnley, A. K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4(5), 197-203.
- CLERICI, M. *et al.* (2008) The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Rep*, v. 9, n. 8, p. 810-8. ISSN 1469-3178.
- COSENTINO-GOMES, D. *et al.* (2013) Inhibition of ecto-phosphatase activity in conidia reduces adhesion and virulence of *Metarhizium anisopliae* on the host insect *Dysdercus peruvianus*. *Curr Microbiol*, v. 66, n. 5, p. 467-74. ISSN 1432-0991.
- DA SILVA FERREIRA, M. E. *et al.* (2006) The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in

Aspergillus fumigatus. *Eukaryot Cell*, v. 5, n. 1, p. 207-11. ISSN 1535-9778.

DE BOER, P. *et al.* (2010) Highly efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using the bi-partite approach in *deltalig4* or *deltaku70* mutants. *Fungal Genet Biol*, v. 47, n. 10, p. 839-46. ISSN 1096-0937.

DUBOVSKIY, I. M. *et al.* (2013) Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e60248. ISSN 1932-6203.

EL-KHOURY, R. *et al.* (2008) Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet*, v. 53, n. 4, p. 249-58. ISSN 0172-8083.

FELL, V. L.; SCHILD-POULTER, C. (2015) The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res*, v. 763, p. 15-29. ISSN 1388-2139.

FERREIRA, A. V. B.; GLASS, N. (1996) PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Newsletter*, v. 43, p. 25-26.

GANDÍA, M. *et al.* (2016) Disruption of *ku70* involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Fungal Biol*, v. 120, n. 3, p. 317-23. ISSN 1878-6146.

GOINS, C. L.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K. (2006) Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genet Biol*, v. 43, n. 8, p. 531-44. ISSN 1087-1845.

GOODARZI, A. A. *et al.* (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J*, v. 25, n. 16, p. 3880-9. ISSN 0261-4189.

- GUANGTAO, Z. *et al.* (2009) Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. *J Biotechnol*, v. 139, n. 2, p. 146-51. ISSN 0168-1656.
- HAARMANN, T.; LORENZ, N.; TUDZYNSKI, P. (2008) Use of a nonhomologous end joining deficient strain (Deltaku70) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis. *Fungal Genet Biol*, v. 45, n. 1, p. 35-44. ISSN 1087-1845.
- HE, Y. *et al.* (2013) Ku70 and ku80 null mutants improve the gene targeting frequency in *Monascus ruber* M7. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, n. 11, p. 4965-76. ISSN 1432-0614.
- JIANG, D. *et al.* (2013) Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv*, v. 31, n. 8, p. 1562-74. ISSN 1873-1899.
- JUNGES, Â. *et al.* (2014) Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *PLoS One*, v. 9, n. 9, p. e107864. ISSN 1932-6203.
- JUÁREZ, M. P. *et al.* (2000) Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *J Invertebr Pathol*, v. 76, n. 3, p. 198-207. ISSN 0022-2011.
- 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*, v. 5, n. 1, p. 212-5. ISSN 1535-9778.
- KRAPPMANN, S. (2007) Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *21(1)*, 25–29.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol*, v. 46, n. 3, p. 205-10. ISSN 0343-8651.

- KÜCK, U.; HOFF, B. (2010) New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 86, n. 1, p. 51-62. ISSN 1432-0614.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. (2012) Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *J Invertebr Pathol*, v. 109, n. 2, p. 248-59. ISSN 1096-0805.
- MEYER, V. *et al.* (2007) Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger* kusA mutant. *J Biotechnol*, v. 128, n. 4, p. 770-5. ISSN 0168-1656.
- NATSUME, T. *et al.* (2004) An appropriate increase in the transcription of *Aspergillus nidulans* *uvrC* improved gene targeting efficiency. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 68, n. 8, p. 1649-56. ISSN 0916-8451.
- NAYAK, T. *et al.* (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, v. 172, n. 3, p. 1557-66. ISSN 0016-6731.
- NINOMIYA, Y. *et al.* (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 33, p. 12248-53. ISSN 0027-8424.
- PÖGGELER, S.; KÜCK, U. (2006) Highly efficient generation of signal transduction knockout mutants using a fungal strain deficient in the mammalian *ku70* ortholog. *Gene*, v. 378, p. 1-10. ISSN 0378-1119.
- ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*, v. 54, p. 1-70. ISSN 0065-2164.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbour, New York: Spring Harbor Laboratory Press.

- SANTI, L. *et al.* (2010) Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, v. 55, n. 4, p. 874-80. ISSN 1879-3150.
- SANTI, Lucélia, SILVA, Walter O. Beys, STANISÇUASKI, Fernanda, CARLINI, Célia R., SCHRANK, Augusto e VAINSTEIN, Marilene Henning. (2006) *Metarhizium anisopliae* como alternativa para o controle do inseto manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Livro de Resumos da VIII reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do centro de Biotecnologia da UFRGS*, pag102.
- 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*, v. 91, n. 1, p. 43-9. ISSN 0022-2011.
- SCHOLTE, E. J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop*, v. 102, n. 3, p. 151-8. ISSN 0001-706X.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, v. 56, n. 7, p. 1267-74. ISSN 1879-3150.
- SEVIM, A. *et al.* (2012) Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Curr Genet*, v. 58, n. 2, p. 79-92. ISSN 1432-0983.
- STAATS, C. C. *et al.* (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 76, n. 4, p. 945-50. ISSN 0175-7598.
- STAATS, C.C *et al.* (2013) *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol*, v. 117, n. 2, p. 137-44. ISSN 1878-6146.

- St Leger RJ, Frank DC, Roberts DW, Staples RC (1992a) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* 204: 991–1001.
- St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW (1992b). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120: 119–124.
- SYMINGTON, L. S. (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 66, n. 4, p. 630-70, table of contents. ISSN 1092-2172.
- VERBEKE, J.; BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M. (2013) Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol Lett*, v. 35, n. 4, p. 571-6. ISSN 1573-6776.
- VILLALBA, F. *et al.* (2008) Improved gene targeting in *Magnaporthe grisea* by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining. *Fungal Genet Biol*, v. 45, n. 1, p. 68-75. ISSN 1087-1845.
- 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*, v. 6, n. 5, p. 808-16. ISSN 1535-9778.
- WELD, R. J. *et al.* (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res*, v. 16, n. 1, p. 31-44. ISSN 1001-0602.
- WILLIAMS, R. S. *et al.* (2008) Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell*, v. 135, n. 1, p. 97-109. ISSN 1097-4172.

YU, J. H. *et al.* (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, v. 41, n. 11, p. 973-81, . ISSN 1087-1845.

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*, v. 55, n. 4, p. 399-407. ISSN 1432-0983.

ZHU, Z. *et al.* (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*, v. 134, n. 6, p. 981-94. ISSN 1097-4172.