

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA – BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

Augusto Bartz Penteriche

**Desenvolvimento de ferramentas para a construção e análise de mutantes
funcionais no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.**

Porto Alegre

2019

Augusto Bartz Penteriche

Desenvolvimento de ferramentas para a construção e análise de mutantes funcionais no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em biotecnologia molecular na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientador: Me. Nicolau Sbaraini

Porto Alegre

2019

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da UFRGS.

Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a toda minha família, em especial ao meu pai e minha mãe, que sempre acreditaram nas minhas escolhas, sempre confiaram nas minhas decisões, e sempre me apoiaram.

Aos meus orientadores, Prof. Augusto Schrank e Me. Nicolau Sbaraini, agradeço por tudo o que me ensinaram. Pela paciência, pela confiança, pela boa vontade, mas principalmente pelas oportunidades que me deram. Hoje trilho novos caminhos graças a elas.

Agradeço, também, aos professores Marilene Vainstein, Charley Staats e Lívia Kmetzsch pela confiança e pelas oportunidades que me foram dadas, e por sempre estarem dispostos a ajudar quando precisei.

Ainda, agradeço aos meus colegas do 217, Matheus, Felipe e Fábio, e a todos os demais dos laboratórios 219, 220 e 222, que passaram e que ainda estão, por me receberem e tornarem os dias de trabalho mais leves, divertidos e sempre bem-humorados.

Por fim, gostaria de agradecer à Brenda, por ter sido minha companheira para todas as horas, parceira em todos os momentos. Por ter me ajudado incontáveis vezes, ter sempre me apoiado, e por juntos termos sido capazes de crescer pessoal e profissionalmente.

Mais que um trabalho, este é o fim de uma importante etapa de vida. Adaptando as palavras de um cara muito inteligente: “se eu cheguei longe, foi por estar sobre o ombro de gigantes”. A todos os citados, e a tantos outros que não cabem nesta página, o meu muito obrigado.

Resumo

O gênero *Metarhizium* é composto por fungos entomopatogênicos de elevada importância, como *Metarhizium anisopliae*, e são extensivamente utilizados para o controle de artrópodes praga como *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda*, ambas pragas de diversas culturas como milho, soja e algodão há mais de cem anos. Atualmente, esporos de *Metarhizium* spp. compõe mais de um terço de todas as formulações fúngicas comerciais para o controle biológico. Ainda assim, estas formulações carecem de eficiência quando comparadas ao controle químico. Para mudar este cenário, diversas abordagens estão sendo empregadas, como o estudo de determinantes de virulência e a engenharia genética para a obtenção de linhagens melhoradas para o controle biológico. No entanto, a escassez de ferramentas moleculares padronizadas aplicáveis aos fungos utilizados em controle biológico atrasa o desenvolvimento de linhagens competitivas, e dificulta o estudo do impacto, disseminação e evolução que esses organismos terão na natureza. A fim de ampliar o repertório de ferramentas moleculares para se trabalhar com *M. anisopliae*, foi construído, no presente trabalho, um *cassette* para a expressão do sistema repórter Katushka, uma proteína fluorescente *far-red* de alto brilho, sob o controle do promotor forte *gpdA* e terminador *TrpC* de *Aspergillus nidulans*, o qual foi transformado em *M. anisopliae*. Katushka é conhecido por ser um sistema eficiente de *gene-reporter* para técnicas de imageamento *in vivo*, e ainda não havia sido padronizada para *M. anisopliae*. Essa construção demonstrou ser geneticamente estável e sua fluorescência pôde ser detectada em besouros adultos de *Ulomoides dermestoides* após o ciclo completo de infecção de *M. anisopliae* expressando Katushka. Ainda, a expressão de Katushka em *M. anisopliae* não influenciou na sua virulência em um bioensaio com larvas de *Tenebrio molitor*, característica importante para que um *gene-reporter* possa ser usado em diversos estudos que enfoquem o processo de infecção. A escassez de promotores endógenos descritos em *M. anisopliae* limita as opções para as análises em nível molecular. Assim, Katushka foi usada como repórter para o *screening* de sequências promotoras de diferentes tamanhos encontradas à montante dos genes *β -tubulina*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gpdMa)*, *gamma-actina* e *trp1* de *M. anisopliae*. As construções de 1.000 pb e 500 pb da *β -tubulina* foram capazes de produzir níveis de

fluorescência similares quando comparadas ao promotor padrão P_{gpdA}. As construções de P_{gpdMa} não se mostraram eficientes. Não foram obtidos mutantes para as construções dos promotores da *gamma-actina* e *trp1* nos *screenings* realizados. Pesquisas adicionais são necessárias para aferir estatisticamente a eficiência desses promotores, bem como os elementos genéticos presentes em suas sequências. Este trabalho resultou na construção de modelos eficientes para estudos moleculares em *M. anisopliae*.

Abstract

The *Metarhizium* genus is composed by important entomopathogenic fungi species, such as *Metarhizium anisopliae*, and have been extensively used for controlling arthropod pests such as *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera frugiperda*, both pests of maize, soy and cotton farms, among others, during the last Century. To date, more than a third of all commercially available fungal formulations for biological control are composed by *Metarhizium* spp. spores. Still, these formulations lack the effectiveness of chemical control. To change this scenario, many approaches have been made, such as the study of virulence determinants and genetic engineering to achieve enhanced strains for biological control. However, the lack of standardized molecular tools applicable to fungi species used for biological control slows the development of competitive strains, and difficult the study of the impact, dissemination and evolution that the released transgenic organisms can have on nature. In order to increase the repertoire of molecular tools available to work with *M. anisopliae*, in this work, a cassette for the expression of the reporter system Katushka, a bright far-red fluorescent protein, under the control of the strong *gpdA* promoter and TrpC terminator from *Aspergillus nidulans* was constructed and transformed in *M. anisopliae*. Katushka is known as an efficient gene-reporter system for *in vivo* imaging techniques, and have not been standardized in *M. anisopliae*. This construction was shown to be genetically stable and its fluorescence detectable in *Ulomoides dermestoides* adult beetles after the whole infection cycle of *M. anisopliae* strains expressing Katushka. Moreover, Katushka expression did not influenced *M. anisopliae* virulence in a *Tenebrio molitor* bioassay, which is an important characteristic for a gene-reporter to be used on a variety of studies that focus on the infection process. The lack of endogenous promoters described in *M. anisopliae* limits the options for molecular scale analysis. As such, Katushka was used as a reporter for the screening of different sized endogenous promoter sequences found upstream of *β -tubulin*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gpdMa*), *gamma-actin* and *trp1* genes from *M. anisopliae*. The 1000 bp and 500 bp *β -tubulin* promoter constructions were able to produce fluorescence levels similar when compared to the standard promoter P*gpdA*. The P*gpdMa* constructions were not efficient. Mutants could not be obtained for *gamma-actin* and *trp1* promoter constructions in the screenings performed. More research is needed to

statistically infer promoter efficiency, as well as the genetic elements present in the sequences. This work resulted in the construction of efficient models for molecular studies in *M. anisopliae*.

Sumário

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| 1.1 | Controle Biológico..... | 11 |
| 1.2 | <i>Metarhizium anisopliae</i> | 12 |
| 1.2.1 | Características do Gênero <i>Metarhizium</i> | 12 |
| 1.2.2 | Interação Fungo-Hospedeiro..... | 15 |
| 1.3 | Sequências promotoras / Elementos regulatórios..... | 19 |
| 1.3.1 | Sistemas de expressão recombinante em fungos filamentosos..... | 21 |
| 1.3.2 | Promotores endógenos de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 23 |
| 1.4 | Proteínas Fluorescentes..... | 25 |
| 1.4.1 | TURBORFP635 (Katushka) | 26 |
| 1.4.2 | IVIS Lumina..... | 28 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 30 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 30 |
| 3. | ARTIGO CIENTÍFICO..... | 31 |
| 3.1. | The Katushka far-red fluorescent protein as an efficient gene-reporter for promoter screening in the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium anisopliae</i> (Hypocreales: Cordycepitaceae)..... | 31 |
| 3.2. | Supplementary Material 1..... | 53 |
| 3.3. | Supplementary Material 2..... | 54 |
| 4. | DISCUSSÃO GERAL..... | 59 |

| | | |
|----|------------------|----|
| 5. | REFERÊNCIAS..... | 66 |
|----|------------------|----|

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Controle Biológico

O controle biológico se caracteriza pelo fenômeno natural onde um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie tem sua população controlada pela ação de um inimigo natural, normalmente por relações de predação, herbivoria, parasitismo, entre outras. Esta característica é utilizada há centenas de anos para controlar populações de pragas indesejadas, como pragas de lavoura e vetores de doenças, pela inserção controlada e intencional de um organismo que exerça uma das relações acima mencionadas com a praga em questão, diminuindo sua população ou atenuando seu dano (Flint *et al.*, 1998).

Ainda que diversas estratégias para o controle biológico tenham sido adotadas ao longo dos anos, o uso de pesticidas químicos continua sendo a principal ferramenta para o controle de populações de artrópodes praga. No entanto, o uso indiscriminado destes pesticidas acarreta em graves problemas ambientais (Balestrieri *et al.*, 2019) e de saúde pública (Xiao *et al.*, 2017), além de acelerar o surgimento de pragas multirresistentes, como de vetores de doenças (Levick *et al.*, 2017; Moyes *et al.*, 2017), e de pragas de lavoura (Tay *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2014).

No Brasil, é crescente o surgimento de pragas resistentes a pesticidas químicos comumente utilizados. A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, por exemplo, é um dos maiores problemas para o cultivo de milho no Brasil e mundo, podendo causar perdas de rendimento em cultivares beirando os 58% (Cruz *et al.*, 1999, Okuma *et al.*, 2018). Linhagens da lagarta resistentes a inseticidas já foram amplamente encontradas nas américas, tanto resistentes a inseticidas químicos (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2018), quanto a proteínas derivadas da tecnologia Bt (Leite *et al.*, 2015).

Lagartas do gênero *Helicoverpa* são outra grande praga das lavouras brasileiras, atacando plantações de algodão, milho, soja, tomate, entre outros. Enquanto que *Helicoverpa zea* é conhecida há mais tempo, sendo considerada praga secundária por não causar perdas significativas, a recente introdução da espécie exógena polífaga *Helicoverpa armigera* tem preocupado agricultores brasileiros (EMBRAPA, 2013). Esta

espécie é conhecida por causar danos significativos em plantações da Ásia, Europa, África e Australásia, sendo herbívora de mais de 180 espécies de planta, de mais de 45 famílias, muitas de importância econômica como algodão, feijão, milho e soja. Diversos casos de resistência adquirida por *H. armigera* já foram descritos, reduzindo as opções disponíveis para o controle desta praga (Tay *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

A utilização de inimigos naturais no controle biológico de pragas é uma alternativa menos impactante ambientalmente, podendo ser inserida em programas integrados de manejo para o controle de pragas resistentes (Stenberg, 2017). Por exemplo, o uso de diferentes espécies de *Trichogramma*, uma mosca que parasita ovos de Lepitoptera, já é amplamente utilizada para o controle de *H. armigera* e outras pestes no Brasil e no mundo há décadas (Parra *et al.*, 2015). Formulações de conídios de fungos entomopatogênicos também têm papel importante no controle de populações de artrópodes praga, com formulações de *Metarhizium Rileyi* em desenvolvimento para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Grijalba *et al.*, 2018) e diversas comercialmente disponíveis para o controle de diferentes artrópodes pragas (Faria & Wraight, 2007). São vastos os relatos na literatura de alternativas biológicas para o controle de pragas que foram implementadas com sucesso, de maneira a tornar mais otimista o futuro do controle biológico como substituto de pesticidas químicos (Cory & Franklin, 2012).

1.2 *Metarhizium anisopliae*

1.2.1 Características do Gênero *Metarhizium*

O principal representante de fungos do gênero *Metarhizium* é *M. anisopliae*. Este fungo foi inicialmente descrito por Metschnikoff (1879) como *Entomophthora anisopliae*, após isolá-lo de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, na Ucrânia. Pouco tempo depois, Metschnikoff o renomeou como *Isaria destructor*, o qual foi posteriormente transferido para o novo gênero *Metarhizium* por Sorokin (1883), sendo então identificado como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Metarhizium* é um gênero de fungos filamentosos entomopatogênicos e acaricidas, pertencentes à classe Hiphomycetes. Algumas das características dominantes do gênero são dadas pela morfologia de suas estruturas, em especial micélios hialinos e septados, e conidióforos, os quais produzem

conídios secos e normalmente verdes, ovais ou cilíndricos, organizados em colunas (Zimmerman, 2007).

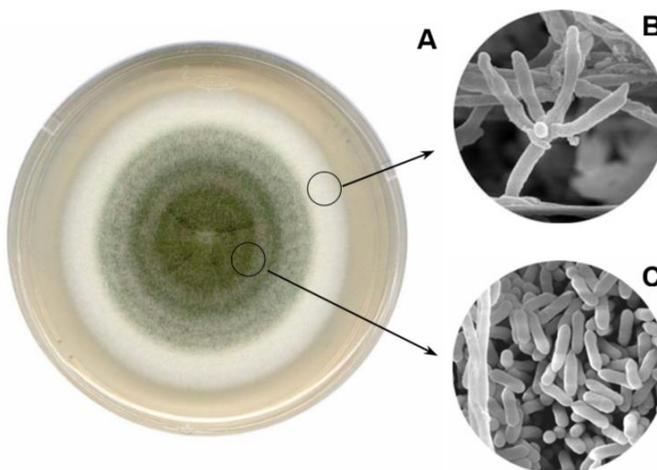


Figura 1. Morfologia de colônia de *Metarhizium anisopliae* E6. (A) Colônia em Meio de Cove Completo (MCC) apresentando conídios típicos de coloração verde. **(B)** Conidióforo de onde emergem os conídios. **(C)** Morfologia oval dos conídios. Imagem de autoria de (Arruda *et al.*, 2005).

A taxonomia das espécies de *Metarhizium* sofreu diversas mudanças ao longo dos anos. A primeira reclassificação, após Sorokin, foi realizada por Tulloch, em 1976, que, baseada em características morfológicas, definiu duas espécies distintas, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, e distinguiu duas formas de *M. anisopliae*: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *anisopliae*, dotada de esporos curtos (5-8 μM); e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *major* (Johnston), dotada de esporos alongados (10-18 μM) (Tulloch, 1976). Nessa classificação, Tulloch considerava *M. album* e *M. anisopliae* como a mesma espécie. Posteriormente, Rombach *et al.* reclassificaram diversas espécies de *Metarhizium* baseado na disposição de suas fiálides, nas características morfológicas dos conídios e nos seus conidióforos, identificado *M. album* como uma espécie diferente, entre outras (Rombach *et al.*, 1987).

A identificação exata da espécie nos isolados de *Metarhizium* spp. é necessária para o registro e/ou patente de qualquer produto contendo este organismo. Assim, métodos mais refinados e precisos foram necessários para a correta identificação de

espécies desse gênero (Junges, 2014). Diversas outras abordagens, independentes de morfologia, foram utilizadas para caracterizar e entender as relações evolutivas entre essas espécies, incluindo: comparação de aloenzimas (St Leger *et al.*, 1992), temperatura (Yip *et al.*, 1992), análises moleculares de RAPD-PCR (Leal *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1997), RFLP (Mavridou & Typas, 1998), RFLP-PCR (Leal *et al.*, 1997) e, posteriormente, comparação de sequências de rDNA (Driver *et al.*, 2000).

A análise de rDNA para comparação filogenética de diferentes grupos taxonômicos tem sido amplamente utilizada e isso se deve ao fato das sequências de rDNA serem altamente conservadas em todos os ramos da vida, com exceção de algumas regiões variáveis. Utilizando essas sequências variáveis, é possível se obter informações valiosas quanto à evolução de um organismo em comparação a outro. Em eucariotos, a sequência variável de rDNA mais utilizada é a ITS (*Internal Transcribed Sequence*). Além de ter sido usada para a identificação e classificação taxonômica de espécies em *Metarhizium* spp. (Driver *et al.*, 2000), a comparação de sequências ITS entre *M. anisopliae* e *Cordyceps* spp. revelou que a espécie *Cordyceps brittlebankisoides* é a forma telomórfica de *M. anisopliae* var. *majus*, transferindo o gênero *Metarhizium* para o filo Ascomycota (Yi Liu *et al.*, 2001). Sequências ITS também são amplamente utilizadas para a identificação de espécies em amostras ambientais (Yun *et al.*, 2018; Mohammadi & Bahramikia, 2019; Pakshir *et al.*, 2019).

Até os dias atuais, o trabalho de referência para a caracterização de espécies de *Metarhizium* é de Bischoff *et al.* que, em 2009, utilizou diferentes marcadores moleculares para discriminar 12 espécies no gênero, sendo elas: *M. anisopliae*; *M. acridum*; *M. brunneum*; *M. globosum*; *M. guizhouense*; *M. lepidiotae*; *M. majus*; *M. pinghaense*; *M. robertsii*; *M. album*; *M. flavoviride* e *M. frigidum* (Bischoff *et al.*, 2009; Oliveira, 2014). Este trabalho também evidenciou que o uso de sequências ITS não é capaz de identificar espécies crípticas em *Metarhizium*, sugerindo que o marcador mais informativo para a identificação de espécies nesse gênero é EF-1 α (*elongation factor 1-alpha*), tendo esta evidência sido suportada por trabalhos subsequentes (Kepler & Rehner, 2013). Ainda assim, algumas das características marcantes do gênero *Metarhizium* são a alta variabilidade fenotípica de espécies evolutivamente próximas, a especificidade de seus

hospedeiros (generalistas e especialistas), a necessidade de diferentes nutrientes, as toxinas produzidas e a virulência, entre outras (Zimmerman, 2007; Schrank & Vainstein, 2010). Dessa maneira, o trabalho de Bischoff *et al.* pode ainda não representar por completo todas as espécies do gênero.



Figura 2. Morfologia de diferentes linhagens de *M. anisopliae*. 1) AL; 2) M5; 3) MT; 4) E6; 5) E9; 6) RJd; 7) Nordeste; 8) CARO7; 9) CARO11; 10) CARO12; 11) CARO14; 12) CARO19; 13) CG27; 14) CG30; 15) CG31; 16) CG33; 17) CG46; 18) CG47; 19) CG87; 20) CG97. Adaptada de (Schrank & Vainstein, 2010).

1.2.2 Interação Fungo-Hospedeiro

Durante o processo de infecção de *M. anisopliae*, o fungo deve se diferenciar em tipos celulares para completar seu ciclo de vida. O modo de infecção de *M. anisopliae* é semelhante ao de outros fungos entomopatogênicos, no entanto, diferentes genes estão envolvidos dependendo da espécie. Por exemplo, os genes de cinases *Hog1* e *Mad1* estão envolvidos no estágio de germinação de *M. acridum* e *M. anisopliae*, respectivamente (Aw & Hue, 2017).

O primeiro estágio é considerado o mais crucial para o estabelecimento da infecção, e diz respeito à adesão dos conídios à cutícula do hospedeiro. Para que haja a adesão dos conídios, grandes mudanças no padrão de expressão gênica devem ocorrer, as quais resultam em gastos energéticos significativos (He *et al.*, 2012; Leão *et al.*, 2015). A cutícula do hospedeiro normalmente apresenta características lipídicas, sendo necessário uma combinação de forças hidrofóbicas passivas, forças eletrostáticas e interações proteicas entre os conídios e a cutícula para que ocorra a adesão (Boucias *et al.*, 1991; Ment *et al.*, 2010). A camada externa dos conídios da maioria dos fungos entomopatogênicos, incluindo *M. anisopliae*, é composta por estruturas em formato de cajado que apresentam hidrofobinas, proteínas específicas que medeiam a adesão passiva às superfícies hidrofóbicas da cutícula dos artrópodes (Wosten *et al.*, 2001). Diferentes fatores podem interferir no processo de adesão e persistência dos conídios na cutícula, como virulência e tipo do esporo do patógeno (Yaginuma *et al.*, 2004; Holder & Keyhani, 2005), comportamento do hospedeiro (Neves & Alves, 2000) e condições ambientais (Tomer *et al.*, 2018).

Após a adesão, a germinação dos conídios é iniciada pela presença de fontes de carbono e nitrogênio na superfície da cutícula do hospedeiro (Ment *et al.*, 2010). Diversas enzimas são responsáveis por garantir o aporte energético e nutricional necessário para uma infecção bem-sucedida. A enzima trealase, que quebra o dissacarídeo trealose comumente encontrado na hemolinfa de insetos, já foi observada durante o processo germinativo de *Metarhizium* (Santi *et al.*, 2010b). Após a adesão inicial, as hidrofobinas são substituídas por adesinas, Mad1 e Mad2 em *M. anisopliae*, as quais conferem uma adesão mais firme e específica à cutícula, permitindo a germinação dos conídios, formação do tubo germinativo e a posterior formação do apressório (Wang & St Leger, 2007a; Aw & Hue, 2017).

O apressório é uma estrutura especializada de penetração que se forma a partir de uma das extremidades do tubo germinativo. Ele é responsável por exercer pressão mecânica de turgor e a secretar diversas enzimas hidrolíticas a fim de romper a cutícula do hospedeiro (Schrank & Vainstein, 2010). Dentre essas enzimas estão incluídas proteases, esterases, lipases, quitinases, aminopeptidases, dipeptidil peptidinasas,

tripsina, entre outras. A presença de diferentes fontes de carbono na cutícula dos hospedeiros induz a produção de diferentes proteases pelo patógeno, provavelmente refletindo sua capacidade de infectar uma vasta gama de hospedeiros. (Wang *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2010a). Quitinases e subtilisinas da família Pr1 têm papel essencial na infecção, e diversos estudos têm elucidado seu papel na virulência de *Metarhizium* (Bagga *et al.*, 2004; Butt *et al.*, 2013; Leão *et al.*, 2015). Adicionalmente, lipases, as quais podem já estar presentes na camada externa dos conídios, são responsáveis por degradar o rico conteúdo lipídico da cutícula do hospedeiro, além de auxiliar na adesão dos conídios por melhorar as interações hidrofóbicas entre o conídio e o hospedeiro pela liberação de ácidos graxos devido a sua atividade lipolítica (Beys Da Silva *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2010b).

Uma vez tendo alcançado a hemolinfa do hospedeiro, o fungo se diferencia novamente em uma outra estrutura especializada denominada blastosporo. Os blastosporos são estruturas unicelulares cilíndricas e levemente ovaladas que facilitam a dispersão do fungo na hemolinfa do hospedeiro (Shrank & Vainstein, 2010). Os blastosporos também são responsáveis pela secreção de diversos metabólitos secundários que auxiliam o fungo a evadir a resposta imune do hospedeiro (Wang & Leger, 2006), responder a estresses (Wang *et al.*, 2007b; 2008), adquirir nutrientes (Zhang & Xia, 2009) e ocasionar a morte do mesmo (Zimmerman, 2007; Shrank & Veinstein, 2010). Dentre os metabólitos, as destruxinas são os que apresentam maior importância por possuírem atividade inseticida. As destruxinas são depsipeptídeos cíclicos, divididas em seis classes (A, B, C, D, E, e desmetil destruxinas B) e, apenas em *M. anisopliae*, já foram encontradas mais de 35 destruxinas diferentes (Liu, Huang & Tzeng, 2004; 2007). Essas toxinas são importantes para diminuir a resposta imune do hospedeiro e danificar seu sistema muscular, ocasionando problemas de motilidade e de alimentação (Pal *et al.*, 2007; Shrank & Vainstein, 2010).

O tempo necessário para causar a morte varia dependendo do hospedeiro e da espécie e linhagem de *Metarhizium*. Uma vez exauridos os nutrientes do artrópode, o fungo passa a se desenvolver sobre o mesmo, mumificando seu cadáver, e produzindo novos conídios para serem dispersos no ambiente (Zimmerman, 2007).

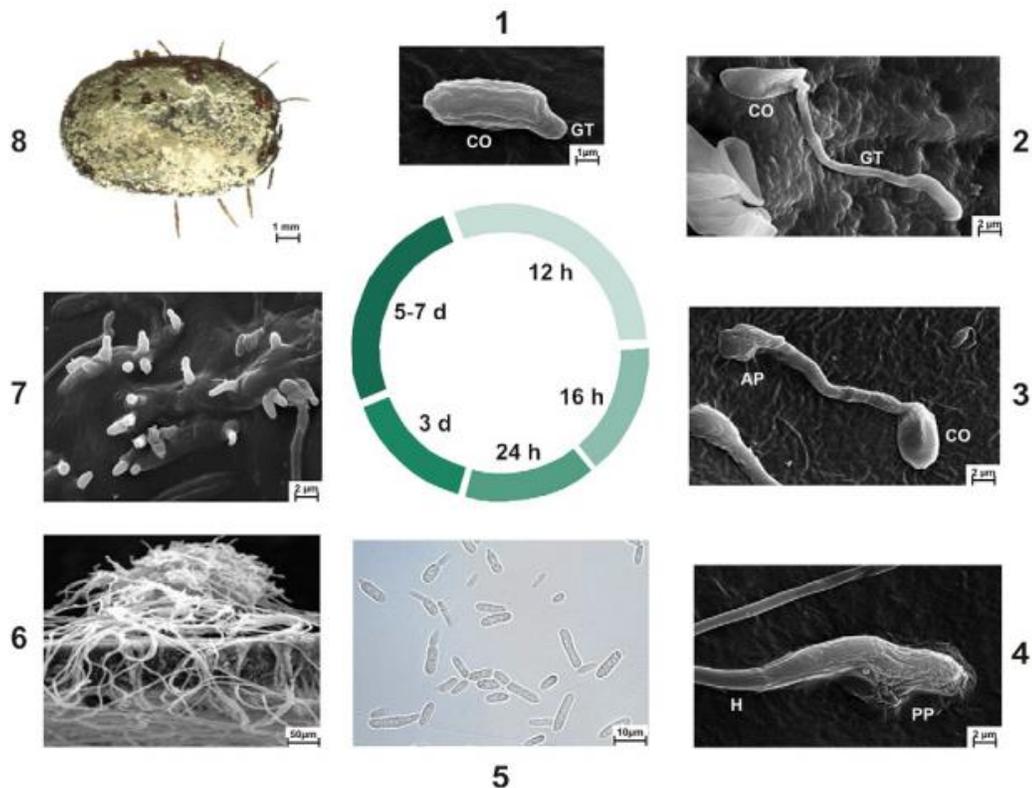


Figura 3. Ciclo de infecção de *M. anisopliae*. (1) Adesão do conídio à superfície do hospedeiro; (2) Formação do tubo germinativo; (3) Formação do apressório; (4) Penetração; (5) Blastosporos na hemolinfa do artrópode; (6) Colonização; (7) Extrusão das hifas do cadáver do inseto; (8) Conídios esverdeados sobre a superfície do hospedeiro morto. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP- apressório, H- hifa, PP- penetração. Modificado de (Schrank e Vainstein, 2010).

No entanto, o sucesso do processo de infecção também depende do comportamento do hospedeiro. Artrópodes estão entre os organismos mais bem-sucedidos evolutivamente em relação à diversidade de espécies, e sua capacidade de evadir microrganismos patogênicos possui elevada importância (Vilcinskas, 2010). Diversos casos de resistência de artrópodes a fungos entomopatogênicos já foram descritos, e se deve ao somatório de diversos fatores (Vilcinskas, 2013). Alguns desses fatores incluem reações comportamentais, como evidenciado em formigas que realizam higienização individual e do ninho para combater a disseminação de micopatógenos (Hughes, Eilenberg & Boomsma, 2002; Tragust *et al.*, 2013). Outro fator de resistência é a carapaça, que além de atuar como barreira física, pode estar recoberta de compostos químicos com ação antifúngica ou inibitória, ou ainda apresentar ausência de nutrientes

para serem utilizados pelos conídios (Ment et al., 2012; 2013). A resposta imune do hospedeiro também tem papel importante na resistência à infecção. A melanização, uma resposta imune primitiva presente em apenas alguns hospedeiros, se dá através da hidroxilação de fenóis e o-fenóis, resultando na formação de melanina a partir de quinonas. Durante este processo, são produzidas espécies reativas de oxigênio, as quais são tóxicas para ambos fungo e hospedeiro (Ment *et al.*, 2012). A melanização ocorre na endocutícula da zona de penetração, a fim de interromper o crescimento do fungo e evitar que ele atinja a hemolinfa, sendo uma forma de defesa importante em insetos como *Galleria melonella* (Chouvenc, Su & Robert, 2009; Ment *et al.*, 2012). Ainda assim, uma vez que o fungo alcança a hemolinfa, dificilmente o artrópode sobreviverá à infecção, enfatizando a importância das enzimas hidrolíticas como determinantes de virulência.

O controle biológico de pragas de lavoura tem se mostrado como uma alternativa viável e ecologicamente amigável para contrapor o uso de defensivos químicos na agricultura. Existem diversas formulações aprovadas comercialmente que fazem uso dessa estratégia, sendo mais de um terço delas à base do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Faria & Wraight, 2007). Ainda assim, as formulações biológicas atuais seguem muito aquém das formulações químicas, principalmente no que diz respeito ao tempo necessário para reduzir a população de pragas na lavoura (St Leger & Wang, 2010).

1.3 Sequências promotoras/elementos regulatórios

A RNA polimerase II (RNAPII) é uma enzima de diversas subunidades responsável por transcrever genes codificantes de proteínas e alguns genes para RNAs não codificantes (ncRNA) em eucariotos, utilizando o DNA genômico como molde para produzir uma molécula de RNA complementar (Thomas & Chiang, 2006). A RNAPII inicia a transcrição em regiões determinadas do genoma, conhecidas como sítios de início de transcrição. A região vizinha destes sítios é conhecida como promotor central, e é definida como a região mínima necessária para direcionar a correta transcrição de um dado gene (Haberle & Lenhard, 2016). O promotor central, em eucariotos, é a região do DNA sobre a qual se monta a maquinaria de transcrição, sendo necessários fatores gerais da transcrição (FGT) para o recrutamento da RNAPII e a correta montagem da maquinaria

de transcrição (Smale & Kadonaga, 2003). Existem seis FGT conhecidos, sendo eles TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF e TFIIH. Dentre eles, o TFIID tem importância central, uma vez que reconhece e se liga a elementos centrais específicos do promotor, criando uma espécie de plataforma sobre a qual os demais FGT e a RNAPII irão se ligar (Kadonaga, 2012). Diversos elementos centrais do promotor já foram descritos em eucariotos e incluem a TATA-box, o iniciador (Inr), elementos à jusante do promotor (DPE), elemento de reconhecimento da TFIIB (BRE), entre outros (Smale & Kadonaga, 2003). Ainda que haja forte conservação destes elementos em diferentes organismos eucarióticos, muitos promotores apresentam diferentes combinações dos mesmos, e muitos não apresentam nenhum desses elementos (Haberle & Lenhard, 2016).

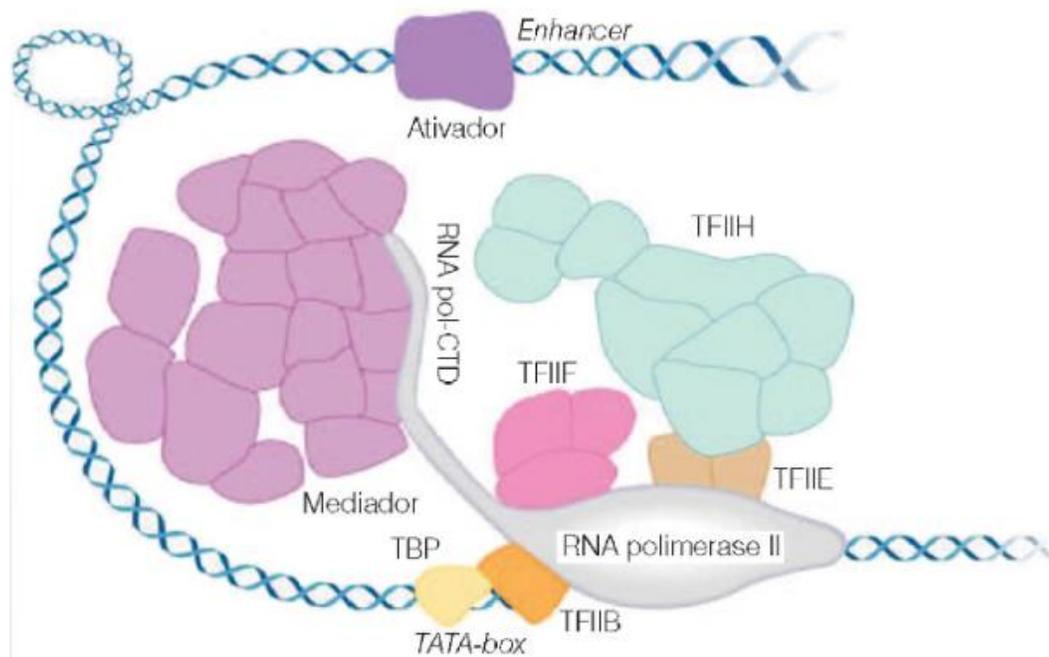


Figura 4. Representação esquemática do complexo de início de transcrição. Molécula de DNA em azul. TBP – Proteína de ligação a TATA, parte do TFIID. Demais fatores estão indicados pela respectiva sigla (TFIIB, E, F e H). Também estão representados o mediador, a RNA polimerase II e um fator de ativação específico (ativador) ligado a um *enhancer*. O mediador liga-se ao domínio C-terminal não fosforilado da RNA polimerase II (RNA pol-CTD) e é necessário para que o ativador estimule o início da transcrição. Imagem de autoria da Sociedade Brasileira de Química (SQB).

Ainda que o promotor central seja suficiente para direcionar a transcrição, o nível basal de transcrição é normalmente baixo, podendo ser reprimido ainda mais por elementos epigenéticos, como a condensação da cromatina, ou proteínas regulatórias de repressão (Haberle & Stark, 2018). A transcrição de promotores eucarióticos é normalmente ativada através de elementos regulatórios conhecidos como *enhancers*, sequências de DNA, muitas vezes distantes do promotor central, sobre as quais ligam-se proteínas regulatórias nomeadas fatores de transcrição (FT). Os FT podem recrutar cofatores de transcrição que, junto com os FT, podem aumentar a transcrição de um gene, independente da sua distância relativa ou orientação (Spitz & Furlong, 2012; Shlyueva, Stampfel & Stark, 2014). Estes elementos regulatórios fazem parte do promotor estendido, e são responsáveis por regular a frequência e a força da transcrição através da interação com o complexo de início da transcrição (Blazeck & Alper, 2013). Ademais, promotores podem ser classificados como constitutivos ou induzíveis, sendo constantemente ativados para a transcrição, ou ativados apenas mediante algum estímulo, respectivamente (Struhl, 1986; Li *et al.*, 2016; Kluge *et al.*, 2018).

Promotores são sequências indispensáveis para a engenharia metabólica de organismos, uma vez que controlam a expressão gênica, e conseqüentemente, os níveis relativos de proteína. Esses elementos são necessários para a otimização de microrganismos a fim de produzir metabólitos de interesse industrial, normalmente pelo uso de promotores de força elevada (Blazeck & Alper, 2013). O uso de promotores induzíveis também tem ganhado força, uma vez que permite a expressão da proteína de interesse apenas quando o crescimento celular desejado foi alcançado, por exemplo (Deaner & Alper, 2016). O controle fino da expressão, sua inductibilidade e seu alcance são de suma importância para a expressão heteróloga de proteínas, já tendo sido utilizados para a produção dos mais diversos metabólitos, como exemplo a produção heteróloga industrial de artemisinina, uma proteína antimalárica, em *Saccharomyces cerevisiae* (Paddon *et al.*, 2013).

1.3.1 Sistemas de expressão recombinante em fungos filamentosos

Desde a invenção da clonagem de DNA, foi possível transferir genes de um organismo para outro com facilidade, permitindo a expressão heteróloga de proteínas

(Cohen *et al.*, 1973; Baeshen *et al.*, 2014). Essa metodologia permitiu grandes avanços para a humanidade, como a produção heteróloga de insulina e do hormônio do crescimento em *Escherichia coli*, em 1978 e 1979, respectivamente. Até o início da década de 1920, pacientes diabéticos eram tratados com insulina extraída do pâncreas de porcos e gado, de uma maneira extremamente ineficiente se comparada a produção recombinante, tendo esta última sido aprovada para uso terapêutico em humanos pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). A partir de então, a produção heteróloga recebeu grandes avanços tecnológicos, principalmente em sistemas procarióticos, utilizando *E. coli*, e sistemas eucarióticos, utilizando *S. cerevisiae*. No entanto, esses avanços não foram equiparáveis para sistemas de expressão em fungos filamentosos, com um grande atraso em seu desenvolvimento, provavelmente devido a maior complexidade da maquinaria de expressão de fungos filamentosos em comparação a bactérias e leveduras (Alberti *et al.*, 2016). Ainda assim, sistemas de expressão em fungos filamentosos apresentam grandes vantagens: fungos filamentosos tendem a possuir sistemas de modificação pós-traducional que são difíceis de se obter em bactérias e leveduras, além de se destacarem por serem eficientes produtores e secretores de proteína (Ward, 2012).

Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* se destacam como grandes produtores industriais de proteínas recombinantes. Linhagens de *Aspergillus niger* já foram reportadas por produzirem e secretarem grandes titulações de proteína com modificações pós-traducionais, como glicosilação, tendo sido obtidas titulações de glucoamilase maiores que 25-30 g/L (Demain & Vaishnav, 2009). Ainda, uma linhagem de *Trichoderma reesei* já foi reportada por produzir 100 g/L de proteína extracelular (Ward, 2012). Fungos filamentosos são indispensáveis para a produção de metabólitos primários, incluindo ácidos cítrico, fumárico, glucônico, graxos, entre outros; e de metabólitos secundários de extrema importância, como penicilina, cefalosporina, taxol, entre outros (**Tabela 1**) (Meyer, 2008).

Tabela 1. Exemplos selecionados de compostos de importância industrial produzidos por fungos filamentosos. Adaptada de (Meyer, 2008).

| Composto | Organismo | Principal área de atuação |
|--------------------------------|---|---|
| Ácidos | | |
| Ácido cítrico | <i>Aspergillus niger</i> | Indústria de alimentos e bebidas |
| Ácido itacônico | <i>A. terreus</i> | Indústria de polímeros |
| Ácido kójico | <i>A. oryzae</i> | Indústria de alimentos |
| Enzimas | | |
| α -Amilase | <i>A. niger, A. oryzae</i> | Indústria de alimentos e de processamento de amido |
| Quimosina | <i>A. niger</i> | Indústria de alimentos |
| Celulase | <i>Trichoderma viride, T. reesei</i> | Indústria têxtil, de papel, e de polpa |
| Celobiohidrolase | <i>T. viride, T. reesei</i> | Indústria têxtil, de papel, e de polpa |
| Glucoamilase | <i>A. phoenicis, Rhizopus delemar</i> | Indústria de processamento de amido |
| Glicose Oxidase | <i>A. niger, A. oryzae</i> | Indústria têxtil, Biosensores |
| Lacase | <i>Trametes versicolor</i> | Indústria têxtil, de papel, e de polpa |
| Lipases | <i>A. niger, A. oryzae</i> | Indústria de alimentos e detergentes |
| Pectina Liase | <i>T. reesei</i> | Indústria de alimentos |
| Proteases | <i>A. niger, A. oryzae, R. delemar</i> | Indústria de alimentos e detergentes |
| Filase | <i>A. niger, A. oryzae</i> | Indústria de alimentos |
| Renina | <i>Mucor miehei</i> | Indústria de alimentos |
| Xilanases | <i>T. reesei, T. konignii, A. niger</i> | Indústria têxtil, de papel, de polpa e de panificação |
| Metabólitos secundários | | |
| Cefalosporina | <i>Acremonium chrysogenum</i> | Indústria farmacêutica |
| Ciclosporina | <i>Tolypocladium nivenum</i> | Indústria farmacêutica |
| Alcaloides de ergot | <i>Claviceps purpurea</i> | Indústria farmacêutica |
| Griseofulvina | <i>P. griseofulvum</i> | Indústria farmacêutica |
| Lovastatina | <i>Monascus rubber, A. terreus</i> | Indústria farmacêutica |
| Penicilina | <i>P. chrysogenum</i> | Indústria farmacêutica |
| Taxol | <i>Taxomyces andrenae</i> | Indústria farmacêutica |
| Zeranol | <i>Fusarium graminearum</i> | Pecuária |

1.3.2 Promotores endógenos de *Metarhizium anisopliae*

Em geral, promotores eucarióticos possuem tamanhos de algumas centenas a milhares de pares de base, significativamente maiores que promotores procarióticos (Redden & Alper, 2015). Em fungos filamentosos, promotores e terminadores de genes

de expressão constitutiva são normalmente utilizados para a expressão de proteínas recombinantes. Dentro dos promotores constitutivos, um dos mais frequentemente utilizados é o promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Aspergillus nidulans* (gpdA). Ainda, diversos promotores induzíveis de diferentes espécies de fungos filamentosos são utilizados, como da taka-amilase (amyA), glucoamilase A (glaA), xilanase (exlA), entre outros (Sharma *et al.*, 2009).

Para um promotor controlar a expressão do gene de interesse de maneira suficiente e eficiente, a maquinaria de transcrição endógena da célula deve ser capaz de reconhecer os elementos regulatórios da sequência promotora exógena (Kuo *et al.*, 2004). Na grande maioria dos casos, o uso de promotores homólogos em respeito à célula hospedeira leva a expressão gênica mais eficiente quando comparado a promotores heterólogos (Sharma *et al.*, 2009). Existe um grande esforço direcionado para o desenvolvimento de sistemas de expressão baseados em promotores homólogos para a expressão de genes recombinantes e a disponibilidade de diferentes tipos de promotores endógenos facilita a expressão heteróloga de genes de interesse em um dado organismo (Nakazato *et al.*, 2006; Kanjo *et al.*, 2019). Em especial, existe uma escassez de promotores endógenos de *M. anisopliae* descritos na literatura.

O *tef-1 α* (*translation elongation factor 1 α*) é uma das proteínas mais abundantes e conservadas nos seres vivos, representando 1-3 % do total de proteínas solúveis em uma célula (Cavallius, *et al.*, 1998). Em *M. anisopliae*, o promotor do gene *tef-1 α* foi descrito baseado no alinhamento filogenético de genes homólogos de diferentes espécies fúngicas e foi utilizado para expressar um *gene-reporter sgfp*, representando o primeiro promotor de gene constitutivo descrito para *M. anisopliae* (Nakazato *et al.*, 2006). Paralelamente, o gene *Mcl1* foi descrito como responsável por produzir uma capa de colágeno protetora em *M. anisopliae*, permitindo que o fungo escape do sistema imune do hospedeiro quando dentro da hemolinfa (Wang & St Leger, 2006). Recentemente, a região reguladora à montante do gene *Mcl1* foi truncada em porções de diferentes tamanhos a fim de expressar o *gene-reporter sgfp*. Dessa maneira foram encontrados promotores de tamanho reduzidos do promotor induzido por hemolinfa pMcl1 (Kanjo *et*

al., 2019). Em buscas na literatura, não foram encontrados outros promotores endógenos de *M. anisopliae* descritos até o momento da redação deste trabalho.

1.4 Proteínas Fluorescentes

Desde a clonagem da proteína fluorescente verde (GFP) em 1992 (Prasher *et al.*, 1992), a descoberta e o desenvolvimento de variantes de proteínas fluorescentes (FP) de diferentes espectros de emissão revolucionou o estudo de sistemas biológicos (Chudakov *et al.*, 2010). O primeiro uso de GFP como marca biológica, em 1994, abriu um enorme leque de novas abordagens possíveis para o estudo de genes, proteínas e organismos num geral, servindo como uma ferramenta única que permitiu a direta visualização de estruturas e processos em células vivas (Chalfie *et al.*, 1994; Chudakov *et al.*, 2010).

FP e outras cromoproteínas da família da GFP são tipicamente formadas por ~220-240 resíduos de aminoácido, aproximadamente 25 kDA, as quais dobram-se em formato de um barril composto de 11 folhas- β que acomodam uma hélice distorcida no seu interior (Ranganathan *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2003; Evdokimov *et al.*, 2006; Loening *et al.*, 2007). O grupo cromóforo, responsável pela cor, é formado por uma modificação pós-traducional única de três resíduos de aminoácidos da hélice, nas posições 65-67 de acordo com a numeração da GFP de *Aequorea victoria*. O resíduo da posição 65 da cadeia lateral que forma o cromóforo pode variar; no entanto, a Tyr66 e a Gly67 são altamente conservadas entre todas as proteínas GFP-*like*. O cromóforo resultante fica localizado bem no centro do barril, e, dessa maneira, fica protegido do contato com o solvente externo. Ainda, a estrutura em barril das FP é estabilizada por múltiplas interações não covalentes que garantem uma estabilidade extremamente alta à desnaturação química e térmica, assim como à proteólise (Bokman & Ward, 1981; Verkhusha *et al.*, 2003). De maneira geral, todas as proteínas GFP-*like* têm a tendência a oligomerizar-se, inclusive a GFP de *Aequorea Victoria*, que é considerada monomérica, forma dímeros quando em altas concentrações, sendo essa uma condição fisiológica em águas-vivas (Chudakov *et al.*, 2010).

São diversas as aplicações possíveis para FP atualmente. Marcação de proteínas para localização subcelular, marcação de organelas, *screening* de drogas, análise de interações proteína-proteína, *gene-reporter* para a descoberta de novos promotores e inúmeras outras são aplicações para FP (Chudakov *et al.*, 2010). Como mencionado, variantes de GFP foram utilizadas como *gene-reporters* para a identificação de promotores endógenos de *M. anisopliae* (Nakazato *et al.*, 2006; Kanjo *et al.*, 2018). Com o advento de equipamentos de imageamento modernos, novas abordagens estão sendo utilizadas, como técnicas não invasivas de visualização *in vivo* de proteínas, tumores, infecções fúngicas, entre outros (Yu *et al.*, 2004; Vanherp *et al.*, 2018). Dessa maneira, existe um intensivo esforço para o desenvolvimento de novas FP, com emissão em diferentes espectros, dentro da janela óptica ideal para visualização através de tecidos vivos (Shcherbo *et al.*, 2007; Chudakov *et al.*, 2010).

1.4.1 TURBORFP635 (Katushka)

A grande dificuldade do imageamento de proteínas, células e tecidos *in vivo* se deve a absorção de luz pela melanina e hemoglobina, assim como pelo espalhamento de luz (Konig, 2000). Tanto o espalhamento quanto a absorção se tornam menos pronunciados à medida que o comprimento de onda da luz aumenta. Dessa maneira, a janela óptica ideal para a visualização através de tecidos vivos é considerada como sendo entre 650 e 1100 nm (Konig, 2000; Chudakov *et al.*, 2010). Assim, o desenvolvimento de FP que emitam forte fluorescência no espectro do *far-red* ou infravermelho são ideais para aumentar a sensibilidade de técnicas de imageamento de organismos inteiros. No momento, uma das FP mais utilizadas para este fim é a proteína TURBORFP635, também conhecida como Katushka (Shcherbo *et al.*, 2007; Chudakov *et al.*, 2010).

Katushka é uma FP dimérica sintética, derivada de uma série de versões melhoradas da FP vermelha de *Entomacmaea quadricolor* eqFP578. Inicialmente, Merzlyak *et al.* (2007) clonaram a proteína dimérica eqFP578, com picos de excitação/emissão 552/578 nm, e desenvolveram uma versão melhorada por meio de mutagênese aleatória, nomeada TagRFP, a qual apresentou maior estabilidade em pH alcalino, maturação mais rápida e maior brilho, tendo picos de excitação/emissão de 553/574 nm (Merzlyak *et al.*, 2007). O nome desta nova proteína foi posteriormente alterado para TurboRFP.

Shcherbo *et al.* (2007) utilizaram a TurboRFP como ponto de partida para desenvolver Katushka, por meio de uma combinação de mutações sítio-específicas e aleatórias. As análises *in vitro* e *in vivo* revelaram que Katushka possui picos de excitação/emissão de 588/635 nm, maturação rápida a 37 °C, e brilho relativo calculado de 0,67 de EGFP, sendo este brilho mais alto que qualquer outra FP com emissão máxima além de 620 nm. A comparação de Katushka com outras FP de espectro vermelho e *far-red* em células bacterianas vivas demonstrou o brilho superior de Katushka na porção *far-red* do espectro (Shcherbo *et al.*, 2007). Assim, Katushka é atualmente considerada como uma das FP preferidas para o imageamento *in vivo* (Chudakov *et al.*, 2010).

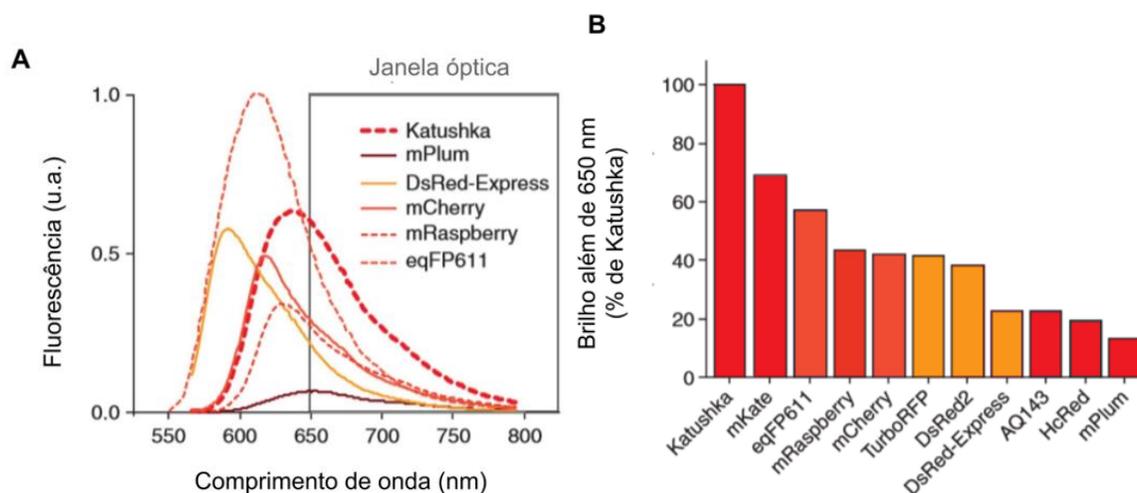


Figura 5. Comparação da proteína Katushka com outras FP. (A) – Espectro de emissão de FP selecionadas proporcionais aos seus brilhos calculados, janela óptica indicada com um retângulo. (B) – Brilho de fluorescência comparado entre Katushka e outras FP selecionadas, calculados como a integral definitiva sobre o limite de comprimento de onda de 650 a 800 nm. Imagem adaptada de (Shcherbo *et al.*, 2007).

1.4.2 IVIS Lumina II

O sistema de imageamento por biofotônica baseado em fluorescência é a base de funcionamento do equipamento IVIS Lumina II, o qual se destaca por ser um método não invasivo e não tóxico de imageamento que pode ser utilizado *in vivo*, uma vez que detecta luz visível produzida pela excitação de proteínas fluorescentes ou por bioluminescência (Andreu *et al.*, 2011). Este equipamento é composto de uma câmera CCD (*Charged Coupled Device*) altamente sensível, acoplada a um compartimento fechado para a detecção de luz e capacidades completas de automação e análise, além de espaço para até 21 filtros e acessórios práticos (Caliper, 2008).

A imagem é obtida pelo aparelho por meio de uma técnica de imagem conhecida como planar. O processo inicialmente apresenta um sistema de aquisição de uma imagem referência do objeto sob iluminação fraca, e a posterior passagem de um forte feixe de luz através de um filtro ajustado conforme o comprimento de onda de excitação do fluoróforo utilizado, para só então incidir-lo sobre o objeto. O sinal biofotônico é capturado no compartimento fechado escuro, por meio de filtros de emissão específicos para os comprimentos de onda desejados, e a intensidade da incidência de fótons é codificada espacialmente pelas câmeras CCD, resultando na sobreposição da escala de cor da imagem e na possibilidade de quantificação (Andreu *et al.*, 2011; Leblond *et al.*, 2010).

Dentre os fatores que influenciam a sensibilidade da detecção de fluorescência, se destacam as propriedades de propagação de luz do tecido vivo, o sinal de autofluorescência do organismo e a disponibilidade de oxigênio. O principal desafio no imageamento óptico está relacionado com a natureza da interação entre luz e matéria, mais especificamente no espalhamento e na absorção de luz. Quando em contato com o tecido, os fótons no espectro de comprimento de onda visível e infravermelho sofrem alto espalhamento, resultando na difusão de fótons. Assim, os fótons não se propagam em uma linha reta, mas sim por caminhos difusos (Andreu *et al.*, 2011). Ainda, a intensidade da luz é reduzida após passar pelo tecido, com uma perda da intensidade de fótons de aproximadamente 10 vezes para cada centímetro de tecido (Contag *et al.*, 1995). Isso se deve à presença de componentes endógenos do organismo que absorvam luz, como a

hemoglobina e a melanina, dificultando a leitura de fluorescência. No entanto, existe uma forte redução da absorção de luz em comprimentos de onda superiores a 600 nm, permitindo dessa forma a passagem de luz vermelha pelo tecido (Andreu *et al.*, 2011).

Dessa forma, o Sistema de Imagem IVIS utiliza um método de subtração da autofluorescência pelo uso de filtros de *background*, ou seja, filtros de excitação na faixa de absorção dos componentes dos tecidos vivos, mais especificamente na faixa do azul, a fim de excitar a autofluorescência do tecido sem excitar o fluoróforo (Figueiredo, 2013). A imagem obtida pelos filtros de *background* é então subtraída da imagem principal obtida pelo filtro de excitação do fluoróforo, de forma a reduzir a autofluorescência e possibilitar a leitura (Troy *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver ferramentas moleculares para o estudo de regiões promotoras e construção de mutantes funcionais no fungo *Metarhizium anisopliae* por meio da construção de vetores baseados na proteína repórter TURBORFP635 (Katushka)

2.2. Objetivos específicos

1 - Padronizar a expressão da proteína fluorescente Katushka em *Metarhizium anisopliae*;

2 – Realizar o *screening* de novos promotores constitutivos, de tamanhos reduzidos, em *Metarhizium anisopliae*;

3. ARTIGO CIENTÍFICO (manuscrito em preparação)

3.1. The Katushka far-red fluorescent protein as an efficient gene-reporter for promoter screening in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Cordycepitaceae)

Title: The Katushka far-red fluorescent protein as an efficient gene-reporter for promoter screening in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Cordycepitaceae)

Authors: Augusto Bartz Penteriche ¹ (abpenteriche@gmail.com), Nicolau Sbaraini ^{1,2} (nicolausbaraini@me.com), Matheus da Silva Camargo ¹ (mtsc.camargo@gmail.com), Felipe Geremia ¹ (felipegeremia@gmail.com), Marilene Henning Vainstein ^{1,2} (mhv@cbiot.ufrgs.br), Charley Christian Staats ^{1,2} (staats@ufrgs.br), Augusto Schrank ^{1,2} (aschrank@cbiot.ufrgs.br)

¹ Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Rede Avançada em Biologia Computacional (RABICÓ), Petrópolis, RJ, Brazil.

² Rede Avançada em Biologia Computacional (RABICÓ), Petrópolis, RJ, Brazil.

* Correspondence: aschrank@cbiot.ufrgs.br

Manuscript addressed to: Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

Journal: Genetics and Molecular Biology

<https://www.gmb.org.br/>

1. ABSTRACT

The *Metarhizium* genus is composed by important entomopathogenic fungi, such as *M. anisopliae*. This species is widely used for controlling arthropod pests such as *H. armigera* and *S. frugiperda*, but it still lacks the effectiveness and lower cost of chemical pesticides to be a competitive environmentally safer alternative. To change this scenario, genetic engineering has been extensively employed, but the lack of standardized molecular tools slows the development of more efficient strains of this species. Herein, a cassette for Katushka expression, a bright far-red fluorescent protein, under the control of the strong *gpdA* promoter and *TrpC* terminator from *A. nidulans* was constructed and transformed in *M. anisopliae*. This construction was genetically stable and its fluorescence could be detected in *U. dermestoides* adult beetles after the whole infection cycle of the fungus. Moreover, Katushka expression did not impair *M. anisopliae* virulence in a *T. molitor* bioassay. Additionally, Katushka was used as a gene-reporter for the screening of different sized endogenous promoter sequences found upstream of *β -tubulin* and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gpdMa*) genes from *M. anisopliae*. The 1000 bp and 500 bp *β -tubulin* were able to produce fluorescence levels similar do *gpdA*, while *gpdMa* could not drive the expression of Katushka.

2. INTRODUCTION

Species from *Metarhizium* genus (Hypocreales: Cordycepitaceae) are entomopathogenic fungi widely used for biological control of crop pests and insect-borne diseases (Zimmermann, 2007). Ticks (Arruda *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2015), mosquitoes (Alkhaibari *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019) and destructive agricultural pests as *Helicoverpa armigera* (Jarrahi *et al.*, 2016) and *Spodoptera* spp. (Han *et al.*, 2014) are all susceptible to *Metarhizium* infection. Due to its vast range of arthropod hosts and overall human and animal safety, *Metarhizium* spp. emerges as a potential alternative for chemical pesticides, whereas it already composes a third of all fungal formulations for biological control commercially available worldwide (Faria and Wraight, 2007; Zimmermann, 2007).

In order to improve the infection efficiency of *Metarhizium* spp., molecular biology and genetic engineering have been employed. The characterization of virulence determinants enrolled in the host-pathogen interaction is central to better biopesticides based in these species (Schrank and Vainstein 2010). Furthermore, the heterologous expression of toxic peptides in *Metarhizium* spp. is also a promising way to ameliorate the infection success (Wang and St leger, 2007; Bilgo *et al.*, 2017). However, one of the barriers for high-throughput modification of *Metarhizium* spp. is the lack of standardized tools for these fungi. During the routine molecular biology experiments in our lab we faced, for example, an absence of promoter sequences available for genetic manipulation of *Metarhizium*. To date, there are only a few *M. anisopliae* endogenous promoter regions described (Nakazato *et al.*, 2006; Kanjo *et al.*, 2019), narrowing options for the development of more efficient strains.

Since the cloning of green fluorescent protein (GFP) in 1992 (Prasher *et al.*, 1992), fluorescent proteins (FP) have been used for many different research purposes, being widely known as efficient gene-reporters and *in vivo* labeling tags (Chalfie *et al.*, 1994; Chudakov *et al.*, 2010).

Together with the development of new imaging systems, FPs allow for fast screening of target-gene promoter activity, quantification of gene expression and sub-cellular protein localization (Hoffman, 2005; Wei and Dai, 2014, Kanjo *et al.*, 2019). Among the vast repertoire of FPs, TURBOFP635, also known as Katushka (Kat), is an engineered far-red bright fluorescent protein, able to be visualized through living tissues (Shcherbo *et al.*, 2007), and not yet standardized in species from *Metarhizium* genus.

In order to verify if the *Kat* gene could be used as an efficient reporter in *M. anisopliae*, this gene was initially cloned under the control of a strong promoter and terminator from *Aspergillus nidulans*. This construction was able to drive the expression of *Kat* gene and the far-red fluorescence was detected. The *Kat* gene expression also did not impaired *M. anisopliae* virulence against *Tenebrio molitor* larvae. Therefrom, the *Kat* gene was used for the screening of putative promoter regions by switching the *A. nidulans* promoter for different sized sequences found upstream of β -tubulin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpdMa) genes of *M. anisopliae*. Two sized promoter sequences were able to drive the expression of the synthetic Kat protein and its relative fluorescence efficiency was compared.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Strains and culture media

M. anisopliae strain E6 was originally isolated from *Deois flavopicta* collected in Espírito Santo State, Brazil (Arruda *et al.*, 2005). Before subsequent experiments, this strain was grown at 28°C in solid Cove's Complete Medium (MCc): containing (w/v): 1 % glucose, 0.6 % NaNO₃, 0.15 % casein hydrolysate, 0.05 % yeast extract, 0.2 % peptone, 1.5 % Agar, pH 7.0 plus 2 % (v/v) Salts Solution (2.6 % KCl, 2.6 % MgSO₄•7H₂O and 7.6 % KH₂PO₄ (w/v)) and 0.04 % (v/v) Trace Elements Solution (0.04 % Na₂Ba₄O₇•7H₂O, 0.4 % CuSO₄•5H₂O, 0.01 % FeSO₄, 0.8 %

Na₂MNO₄•7H₂O, 0.8 % MnSO₄•7H₂O and 0.8 % ZnSO₄•7H₂O (w/v)) (modified from (Cove, 1966)). For transformant's maintenance, solid Cove's Medium (MC) containing (w/v): 1 % glucose, 0.6 % NaNO₃, 1.5 % Agar, pH 7.0, plus 2 % (v/v) Salts Solution (as described above), 0.04 % (v/v) Trace Elements Solution (as described above) and 10 µg/mL of Chlorimuron Ethyl (CE) was employed. For mitotic stability, mutants were grown in MCc medium without the selection agent. *Escherichia coli* strain TG2 was employed in routine cloning, and *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 was employed to perform *Agrobacterium*-mediated transformation of *M. anisopliae*. Bacteria were obtained from the laboratory's own collection and maintained in Luria-Bertani (LB) medium with the appropriate antibiotics (Green and Sambrook, 2012).

3.2. *Katushka*'s plasmid construction

In order to construct the plasmids for expression of the *Kat* gene, firstly, the gene *SUR* from *Magnaporthe oryzae*, that confers resistance to CE (Lin *et al.*, 2011), was introduced in the HindIII site of the binary vector pPZP201BK, through the Hot fusion cloning method (Fu *et al.*, 2015) (this cloning method was used in all cloning steps here described), in order to generate the plasmid pPZP201BK::SUR. The *Kat* gene was PCR amplified from the plasmid pJAF15::H3P::Kat::H3T, (i. e., where the gene is under control of the Histone 3 promoter and terminator of *Cryptococcus neoformans*) and cloned in the NcoI and BamHI sites of the plasmid pAN::gpdA::BAR::TrpC, in order to generate the plasmid pAN::gpdA::Kat::TrpC (i. e., NcoI and BamHI digestion released the *BAR* gene). The *Kat* expression cassette, gpdA::Kat::TrpC, was PCR amplified and cloned in the EcoRV site of the plasmid pPZP201BK::SUR, to generate the plasmid pPZP201BK::SUR::gpdA::Kat::TrpC.

3.3. Screening of new promoters

Genomic DNA of *M. anisopliae* strain E6 was used as a template to amplify regions of 1000 bp upstream of the initial codon of *β -tubulin* (Genbank accession number MANI_018534) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpdMa*) (Genbank accession number MANI_017852) genes through polymerase chain-reaction (PCR). Primer sequences are listed in Supplementary Material 1. The amplified fragments were initially cloned in the NcoI site of the plasmid pAN::gpdA::Kat::TrpC, to generate the plasmids: pAN::gpdA::pMANI_018534(1000pb)::Kat::TrpC and pAN::gpdA::pMANI_017852(1000pb)::Kat::TrpC. Subsequently, different fragments containing different lengths of the putative promoters (i. e., 1000, 750 and 500 pb), the *Kat* gene and the TrpC terminator were PCR amplified and cloned in the EcoRV site of the plasmid pPZP201BK::SUR (Generated plasmids are described in Table 1).

3.4. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

The 7 constructs were individually transformed into *M. anisopliae* by *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) method as previously described (Staats et al., 2007). Briefly, *A. tumefaciens* liquid LB cultures carrying the different versions of pPZP201BK::SUR (harboring the different cassettes for Kat expression) were diluted from a previous pre-inoculum to 0.15 (OD₆₆₀) in liquid Induction Medium (IM) amended with acetosyringone (200 μ M). The cultures were incubated at 28 °C and 200 rpm until OD₆₆₀ reaches 0.4. Subsequently, a *M. anisopliae* spore suspension (10⁶ spores per mL⁻¹) and the resultant growth of the *A. tumefaciens* cultures were mixed together in a 1:1 ratio and plated onto cellulose membranes disposed over solid IM plates. The plates were incubated for 48 hours at 25 °C (i.e., co-cultivation), and the membranes were then transferred to MC plates supplemented with 200 μ g/mL of cefotaxime and 10 μ g/mL of CE, and covered with a top layer of soft MC agar containing the same concentration of antibiotics.

Emerging clones were transferred to a new MC plate supplemented with 10 µg/mL CE for additional selection.

3.5. Katushka's screening

The screening for Kat expression was initially carried out by qualitative detection of the far-red fluorescence using the FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) with the red filter parameters, subsequently, the screening was carried out using the Living Image 3.1 software in IVIS Lumina II (PerkinElmer). The parameters were set to 60 seconds exposure time, excitation at 535 nm and 465 nm (for background removal), using the dsRed emission filter. Furthermore, mutants harboring *gpdMa* or beta-tubulin promoter constructs were additionally evaluated by PCR amplifying the expression cassette (positive) and the *gpdA* promoter (negative).

3.6. Virulence assays

In order to evaluate the possible impact of Kat expression on *M. anisopliae* virulence and infection cycle, a bioassay was conducted with *Tenebrio molitor* larvae. Besides the wild type strain, four transformants (containing the *gpdA::Kat::TrpC* cassette), that exhibited strong Kat expression, were employed (i.e., named *gpdA-Kat.1*, *gpdA-Kat.4*, *gpdA-Kat.8* and *gpdA-Kat.10*). Furthermore, in order to evaluate if Kat fluorescence could be detected in mummified hosts, assays were conducted with *Ulomoides dermestoides* adult beetles, employing the wild type and *gpdA-Kat.10* strains. Both, *T. molitor* larvae and *U. dermestoides* beetles were obtained from a local supplier and kept at room temperature, provided with oatmeal (for *T. molitor*) and peanut (for *U. dermestoides*) as food source.

In the *T. molitor* bioassay, 20 five-instar larvae were infected by immersion in a fresh conidia suspension (10^8 spores per mL⁻¹) of each strain for 30 s. The excess liquid was drained, and larvae

were disposed on Petri dishes containing a moistened filter paper. *T. molitor* larvae were incubated at 28°C. As a control, larvae were washed in the same way with sterile water. Three biological replicates were performed, and insect mortality was monitored daily. After each count, 500 µL of sterile distilled water were added to each plate to keep a high humidity for fungal infection. Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism 6 (GraphPad software).

In the infection assay with *U. dermestoides*, three insects were inoculated with 10 µL of spore suspension (10^8 spores per mL⁻¹) of each strain. Insects were kept at Petri dishes containing moistened filter paper and incubated at 28°C for two weeks. Daily, 500 µL of sterile distilled water were added to each plate to keep a high humidity for fungal infection.

4. RESULTS

4.1. Mitotic stability and fluorescence detection for the transformants harboring the **gpdA::Kat::TrpC** cassette

To assess if the Katushka (Kat) protein could be produced by *M. anisopliae*, the cassette **gpdA::Kat::TrpC** was transformed via ATMT in *M. anisopliae* E6 (WT). Multiple transformants were initially isolated employing the selective medium. All colonies isolated were submitted to an initial far-red fluorescence screening employing FLoid Cell Imaging Station. Those that showed a significant increase in fluorescence compared to WT were evaluated employing the IVIS Lumina II equipment (**Figure 1A**). Four transformants displayed intense far-red fluorescence (gpdA-Kat.1, gpdA-Kat.4, gpdA-Kat.8 and gpdA-Kat.10) demonstrating that the Kat protein can be produced in *M. anisopliae*. Furthermore, to evaluate mitotic stability, the four selected transformants displaying intense far-red fluorescence were cultured for three consecutive generations on MCc medium without any selection drug and fluorescence was also evaluated in insect's mummified bodies. After

culturing, the mutants still presented high fluorescence levels (data not shown). Similarly, the Kat protein could also be detected after the infection cycle (**Figure 1B**). Both assays proved that the constitutive expression of the *Kat* gene, drove by the *gpdA* promoter, is mitotic stable in *M. anisopliae*.

4.2. Virulence assay

To validate if Kat could be a good gene-reporter in *M. anisopliae*, a virulence assay with *T. molitor* mealworms was conducted with the selected transformants displaying intense far-red fluorescence (**Figure 2**). Noteworthy, all mutants did not display alterations in the virulence to the *T. molitor* larvae, indicating that Kat expression do not impair virulence capacity of *M. anisopliae*.

4.3. Screening of new promoter sequences

In order to assess the efficacy of Kat as a gene-reporter for promoter screening in *M. anisopliae*, different sized endogenous promoter sequences, upstream of *beta-tubulin* and *gpdMa* genes, were cloned upstream of the Kat coding sequence, generating six putative Kat expression cassettes. These cassettes were transformed via ATMT in *M. anisopliae*, and obtained transformants that presented normal growth in the selective medium had their fluorescence initially evaluated in FLoid Cell. For the *β-tubulin* construction, three independent mutants of the 1000 bp promoter expression cassette and a single mutant of the 500 bp promoter expression cassette presented greater fluorescence when compared to the WT, whereas for the *gpdMa* construction, a single mutant of the 750 bp promoter expression cassette and two independent mutants of the 500 bp promoter expression cassette presented higher fluorescence levels. To analytically quantify and compare the fluorescence of this mutants with the *gpdA*-Kat mutants, colonies were plated together in a petri dish and fluorescence was quantified employing the IVIS Lumina II equipment (**Figure**

3). While the transformants harboring 1000 pb *β-tubulin* promoter expression cassettes showed fluorescence levels similar to the *gpdA*-Kat construction, the transformants harboring *gpdMa* promoter expression cassettes did not. (**Figure 4**). All seven mutants have also been confirmed by PCR (**Supplementary Material 1**).

5. DISCUSSION

M. anisopliae spores are widely employed for biological control of agricultural pests, however its overall efficacy is still far below from chemical pesticides, even though they are known to cause a series of environmental and health related issues (Cassereau *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2017; Balestrieri *et al.*, 2019). Approaches relying on genetic engineering to develop enhanced strains offer a huge potential to change this scenario, but also requires a careful thought on the impact that genetically engineered organisms may pose to nature. These concerns emphasize the need for tools capable of detecting and monitoring the dissemination of modified strains in field tests prior to the commercial release of products containing such organisms.

Herein, an efficient expression cassette able to produce detectable amounts of the far-red fluorescent Katushka protein in the entomopathogen *M. anisopliae* was described. To achieve that, the strong *gpdA* promoter and TrpC terminator from *A. nidulans* were fused upstream and downstream of the Katushka CDS, respectively, and transformed in *M. anisopliae*. Furthermore, it was shown that this construction is stable, and its fluorescence can be detected after the whole infection cycle of the fungus. The production of Katushka protein also did not impair the virulence of *M. anisopliae* E6 mutants, proving that it can be used as an efficient gene-reporter for assays that depends on or study the infection process. Gene-reporters with these features are important

tools for the characterization of virulence determinants that allow for the selection of more efficient strains.

Considering the gene manipulation advances in the last years, fast screening reporters are essential tools for the development of genetically modified fungi for improving biocontrol effectiveness, as well as studying their impact in the environment (St Leger and Wang, 2010; Wang *et al.*, 2011). Other gene-reporters, such as *sgfp*, are already used for ecological studies on the dispersion of applied fungi on the field, as well as for promoter screening (Nakazato *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Kanjo *et al.*, 2019). However, reporters such as GFP are not ideal for *in vivo* imaging due to their lower emission spectrum, a part from being more laborious to detect by conventional microscopy techniques. Nonetheless, the Kat protein stands out for its capability of being detected *in vivo* due to its bright far-red fluorescence emitted inside the optical window for the visualization through living tissues, allowing for more comprehensive studies (Shcherbo *et al.*, 2007; Chudakov *et al.*, 2010).

To show that the Kat protein can be used as a gene-reporter for promoter screening in *M. anisopliae*, different sized putative promoters, upstream of endogenous house-keeping genes (i.e. *β -tubulin* and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), were cloned upstream of the *Kat* coding sequence and transformed in *M. anisopliae* via ATMT. Although mutants were obtained only for some constructions, it was found that both *β -tubulin* 1000 bp and 500 bp promoters are able to drive the expression of *Kat* gene-reporter in levels similar to the *gpdA* promoter, which contains 2305 bp. The *gpdA* promoter has been extensively used for the modification of entomopathogenic fungi (St Leger *et al.*, 1996a; Fen *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009), however, the characterization of endogenous promoters from entomopathogenic fungi as *Beauveria bassiana* and *Metarhizium acridum* presented significantly stronger activities in their respective hosts than

the *A. nidulans* *gpd* promoter (Liao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2012). This is possibly due to the transcription and translation machinery of each organisms being different, even in evolutionary close relatives such as entomopathogenic fungi. As so, the use of endogenous promoters to drive the expression of target genes is a better approach to develop enhanced strains of mycoinsecticides. In regards to the genetic manipulation needed for the construction of expression vectors in entomopathogenic fungi, promoter sequences of smaller sizes present a major advantage, particularly due to higher integration efficiency and easier cloning (Zhao *et al.*, 2016; Kanjo *et al.*, 2019).

Confirmed mutants were also achieved for the 750 bp and 500 bp *gpdMa* promoter constructions. Although they had detectable fluorescence levels in the FLoid Cell screening (data not shown), their fluorescence was not enough to be detected against the WT background in the IVIS Lumina equipment. This is probably due to regulatory elements present or absent in the smaller promoter sequence, as repressor or transcriptional factor binding sequences, respectively. Still, more research is needed to characterize a smaller, endogenous *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* promoter of *M. anisopliae*. Nevertheless, the 1,000 bp and 500 bp constitutive endogenous *β -tubulin* promoter sequences offer a new possible tool for the development of transgenic enhanced *M. anisopliae* strains. Hence, the Kat protein was proven to be an efficient gene-report for fast promoter screening in the entomopathogen *M. anisopliae*.

6. CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the financial support made by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant: Universal 2014 458160/2014-8], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Grant: Biocomputacional Processo 23038.010041/2013–13], Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do RJ (FAPERJ), and is part of the Advanced Network of Computational Biology (RABICÓ). The publication charges for this article were funded by CAPES (process no. 23038.010041/2013–13).

REFERENCES

1. Alkhaibari AM, Carolino AT, Bull JC, Samuels RI, Butt TM (2017) **Differential Pathogenicity of *Metarhizium* Blastospores and Conidia Against Larvae of Three Mosquito Species.** *J Med Entomol*, **54**(3):696-704.
2. Arruda W, Lübeck I, Schrank A, Vainstein MH (2005) **Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks.** *Exp Appl Acarol*, **37**(3-4):231-244.
3. Balestrieri A, Gazzola A, Formenton G and Canova L (2019) **Long-term impact of agricultural practices on the diversity of small mammal communities: a case study based on owl pellets.** *Environ Monit Assess* 191:725. doi: 10.1007/s10661-019-7910-5
4. Bilgo E, Lovett B, Fang W, Bende N, King GF, Diabate A, St. Leger RJ (2017) **Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against insecticide-resistant malaria-vector mosquitoes.** *Scientific Reports*, **7**(1):3433.

5. Cao Y, Jiao R and Xia Y (2012) **A strong promoter, PMagpd, provides a tool for high gene expression in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum***. *Biotechnol Lett* 34:557–562. doi: 10.1007/s10529-011-0805-3
6. Cassereau J, Ferré M, Chevrollier A, Codron P, Verny C, Homedan C, Lenaers G, Procaccio V, May-Panloup P, Reynier P (2017) **Neurotoxicity of Insecticides** *Current Medicinal Chemistry*, 24, 2988-3001
7. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) **Green fluorescent protein as a marker for gene expression** *Science*, 263(5148):802-805.
8. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA (2010) **Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues** *Physiol Rev*, 90(3):1103-1163.
9. Cove DJ (1966) **The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 113(1):51-56.
10. Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ and Pei Y (2007) **Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase**. *Appl Environ Microbiol* 73:295–302. doi: 10.1128/AEM.01974-06
11. Faria MRd, Wraight SP (2007) **Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types**. *Biological Control*, 43(3):237-256.
12. Fu C, Donovan WP, Shikapwashya-Hasser O, Ye X, Cole RH (2015) **Hot Fusion: An Efficient Method to Clone Multiple DNA Fragments as Well as Inverted Repeats without Ligase**. *PLOS ONE*, 9(12):e115318.

13. Green M, Sambrook J (2012) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 4th Edition edn. Spring Harbor Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbour.
14. Han JH, Jin BR, Kim JJ, Lee SY (2014) **Virulence of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the Microbial Control of *Spodoptera exigua*.** *Mycobiology*, 42(4):385-390.
15. Hoffman RM (2005) **Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging.** *J Biomed Opt*, 10(4):41202.
16. Jarrahi A, Safavi SA (2016) **Fitness costs to *Helicoverpa armigera* after exposure to sub-lethal concentrations of *Metarhizium anisopliae sensu lato*: Study on F1 generation.** *Journal of Invertebrate Pathology*, 138:50-56.
17. Liao XG, Fang WG, Zhang YJ, Fan YH, Wu XW, Zhou Q and Pei Y (2008) **Characterization of a highly active promoter, *PBbgpd*, in *Beauveria bassiana*** *Curr Microbiol* 57:121–126. doi: 10.1007/s00284-008-9163-3
18. Lin L, Wang F, Wei D (2011) **Chlorimuron ethyl as a new selectable marker for disrupting genes in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii*.** *J Microbiol Methods*, 87(2):241-243.
19. Kanjo K, Surin SI, Gupta T, Dhanasingh M, Singh B, Saini GK (2019) **Truncated, strong inducible promoter *Pmcl1* from *Metarhizium anisopliae*.** *3 Biotech*, 9(3):75.
20. Nakazato L, Dutra V, Broetto L, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A (2006) **Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1alpha* homologous promoter.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(3):521-528.

21. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) **Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.** *Gene*, 111(2):229-233.
22. Rodrigues J, Borges PR, Fernandes EKK, Luz C (2019) **Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis** *Acta Trop*, 193:192-198.
23. Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zraisky AG, Lukyanov S *et al* (2007) **Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging** *Nat Methods*, 4(9):741-746.
24. Schrank A, Vainstein MH (2010) ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins** *Toxicon*, 56(7):1267-1274.
25. Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Vainstein MH, Schrank A (2007) **Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*** *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(4):945-950.
26. St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ and Roberts DW (1996) **Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6349–6354. doi: 10.1073/pnas.93.13.6349
27. St. Leger RJ and Wang C (2010) **Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests** *Appl Microbiol Biotechnol* p. 901–907.
28. Wang CS, St Leger RJ (2007) **A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide.** *Nature Biotechnology*, 25(12):1455-1456.

29. Wang S, O'Brien TR, Pava-Ripoll M and St Leger RJ (2011) **Local adaptation of an introduced transgenic insect fungal pathogen due to new beneficial mutations**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20449–20454. doi: 10.1073/pnas.1113824108
30. Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, Beys-da-Silva WO, Martins JR, Schrank A (2015) **Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions**. *Veterinary Parasitology*, **207**(3-4):302-308.
31. Wei T, Dai H (2014) **Quantification of GFP signals by fluorescent microscopy and flow cytometry**. *Methods Mol Biol*, 1163:23-31.
32. Xiao X, Clark JM, Park Y (2017) **Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes** *Food Chem Toxicol* 105:456–474. doi:10.1016/j.fct.2017.05.003.
33. Zhao H, Lovett B and Fang W (2016) **Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi**. *Adv Genet* 94:137–163. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.001
34. Zimmermann G (2007) **Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*** *Biocontrol Sci Tech*, 17.

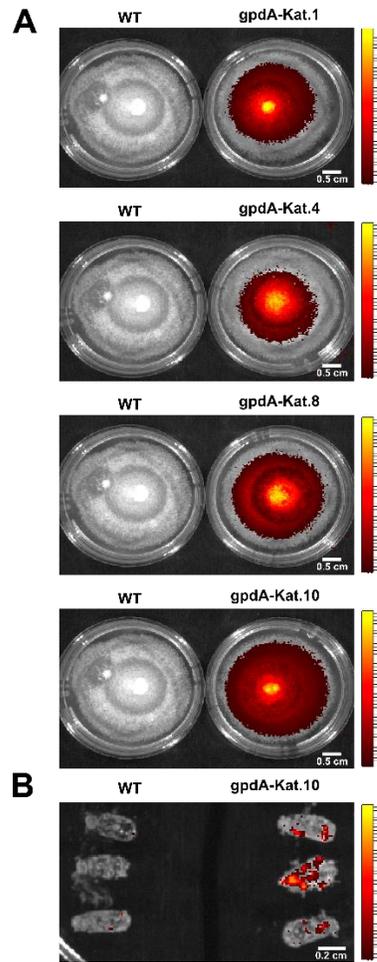


Figure 1. Katushka far-red detection through IVIS Lumina II. (A) – Four mutants harboring the Kat expression cassette with the *gpdA* promoter showing bright far-red fluorescence compared to WT. **(B)** – Adult beetles of *U. dermestoides* were infected with WT and *gpdA-Kat.10* and had their fluorescence detected after two weeks of incubation at 28 °C, showing that fluorescence can be detected in the host after the whole infection cycle of the pathogen.

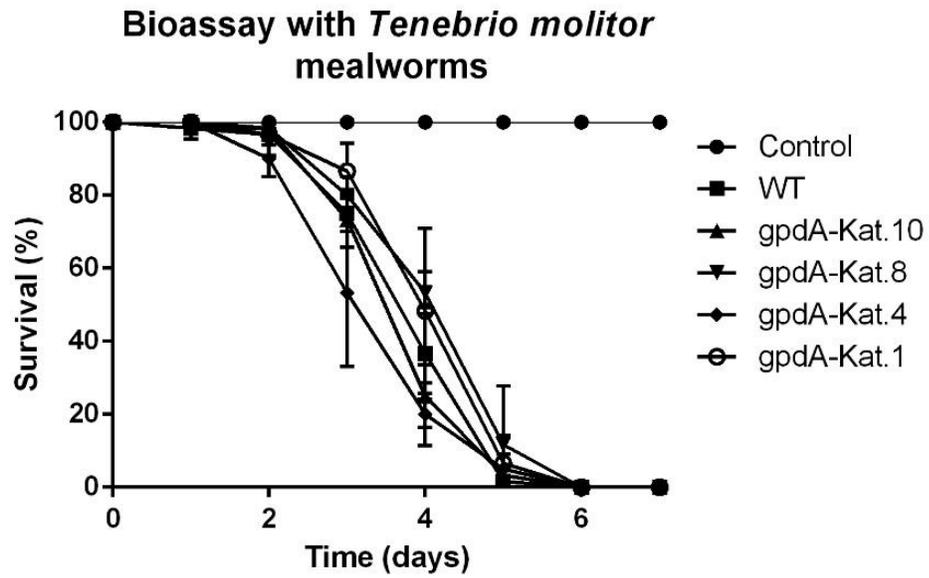


Figure 2. Bioassay with *T. molitor* mealworms. Twenty *T. molitor* larvae were infected with WT and gpdA-Kat mutants, in triplicate. Death count was done daily. Bars represent standard deviation. There was no statistical difference in the death count between assays.

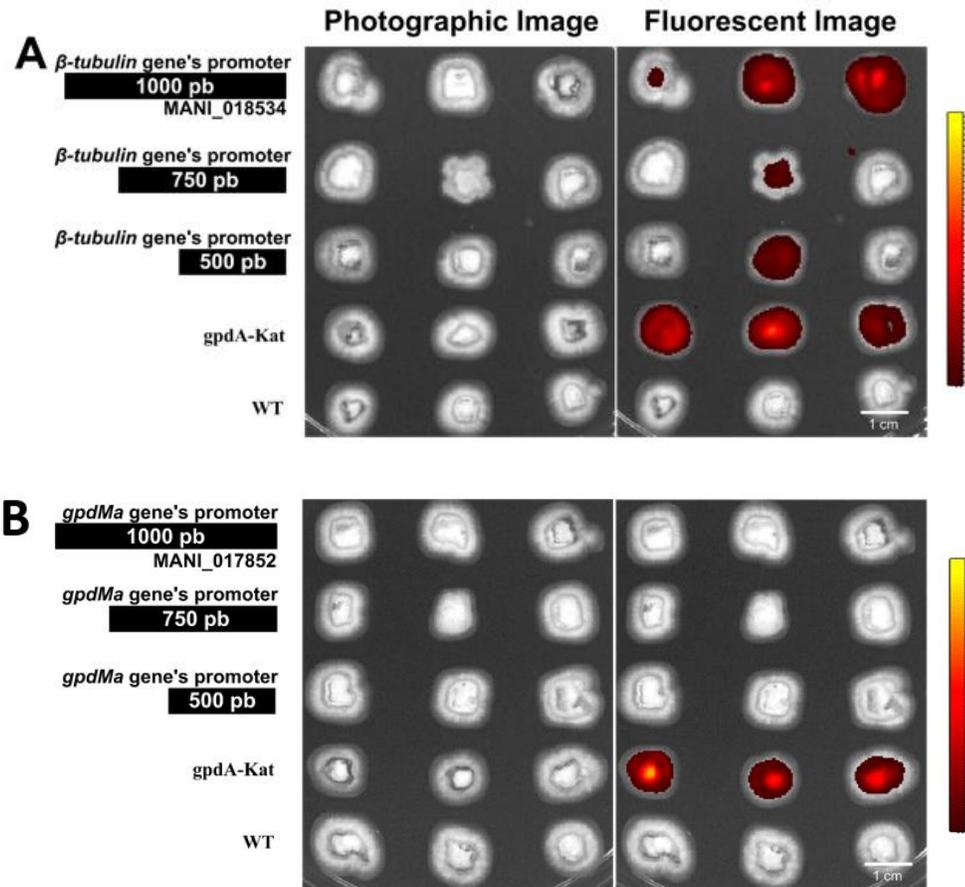


Figure 3. Promoter screening through Katushka far-red detection. Mutants from the different sized promoter transformation that showed fluorescence in the FLoid Cell screening were plated together with the confirmed gpdA-Kat mutants, and WT to compare fluorescence. **(A)** – *β-tubulin* promoter with different sizes. **(B)** – *gpdMa* promoter with different sizes.

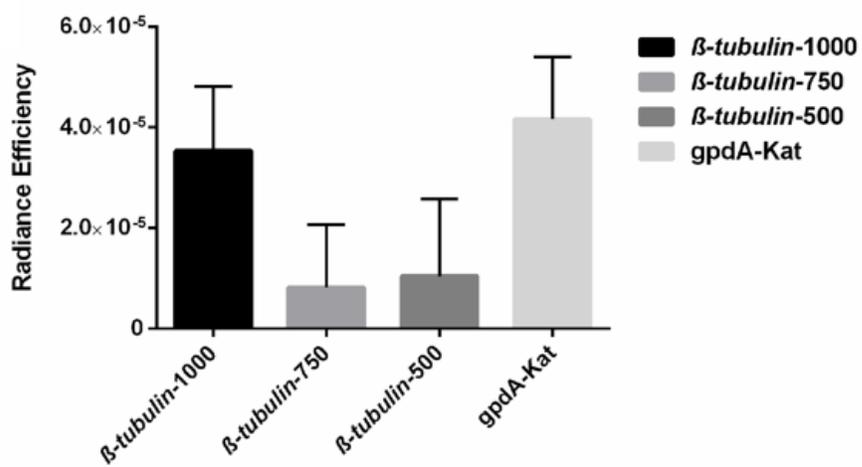


Figure 4. Relative quantification of fluorescence of β -tubulin promoter mutants. Quantification was done through Living Image 3.1 Software of IVIS Lumina II. Bars represent standard deviation.

Table 1 – Plasmids name and description

| Plasmid | Description |
|---|---|
| pPZP201BK | Standard <i>M. anisopliae</i> Transforming Vector |
| pPZP201BK::SUR | pPZP201BK with sulphonylurea resistance gene from <i>M. oryzae</i> (SUR) |
| pJAF15::H3P::Kat::H3T | Plasmid harboring the Katushka CDS |
| pAN::gpdA::BAR::TrpC | Plasmid harboring the gpdA promoter and TrpC terminator |
| pAN::gpdA::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette |
| pPZP201BK::SUR::gpdA::Kat::TrpC | Vector harboring the Kat expression cassette used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pAN::gpdA::pMANI_018534(1000bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>β-tubulin</i> 1000 bp promoter |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_018534(1000bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>β-tubulin</i> 1000 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_018534(750bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>β-tubulin</i> 750 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_018534(500bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>β-tubulin</i> 500 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pAN::gpdA::pMANI_017852(1000bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> 1000 bp promoter |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_017852(1000bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> 1000 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_017852(750bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> 750 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |
| pPZP201BK::SUR::pMANI_017852(500bp)::Kat::TrpC | Plasmid harboring the Kat expression cassette with the <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> 500 bp promoter, used to transform <i>M. anisopliae</i> |

3.2. Supplementary Material 1

Table S1 – Primer name and sequence

| Primer | Sequence |
|---------------------------------|---|
| gpdA_CDSKat_F | cgcttgagcagacatcaccatgggtgggtgaggatagc |
| TtrpC_CDSKat_R | gatttcagtaacgtaagtgtcagctgtgccccagttg |
| pPZP_HindIII_gpdA_Kat_F | agaggcctagggcgccactgtacagtgaccgggtgact |
| pPZP_HindIII_trpC_Kat_R | aaacgacggccagtgccagagtaaagaagaggagcatg |
| pPZP_EcoRV_SUR_F | acgaattctaattaagattcgacgtgccaacgccacag |
| pPZP_EcoRV_SUR_R | cccgggtaccgagctcgattcgacgtgagagcatgcaattc |
| Kat_screening_F | ggtgccctccatgtacagttca |
| PAN_P18534_1000p_F | cgcttgagcagacatcacttgcacgaacgatttgag |
| PAN_P18534_1000p_R | gctatcctcaccaccatgttggcggattatcgtcg |
| pPZP_HindIII_P18534_1000p_Kat_F | agaggcctagggcgccattgcacgaacgatttgag |
| pPZP_HindIII_P18534_750p_Kat_F | agaggcctagggcgccagtaaccagagtttccggg |
| pPZP_HindIII_P18534_500p_Kat_F | agaggcctagggcgccatactactgtactctccattc |
| PAN_P17853_1000p_F | cgcttgagcagacatcacaccggagacacgtttga |
| PAN_P17853_1000p_R | gctatcctcaccaccatttgcgtgtgtgtatag |
| pPZP_HindIII_P17853_1000p_Kat_F | agaggcctagggcgccaaccggagacacgtttga |
| pPZP_HindIII_P17853_750p_Kat_F | agaggcctagggcgccataacgaattgttccccg |
| pPZP_HindIII_P17853_500p_Kat_F | agaggcctagggcgccatcgtctcgttgaatagcg |

3.3. Supplementary Material 2

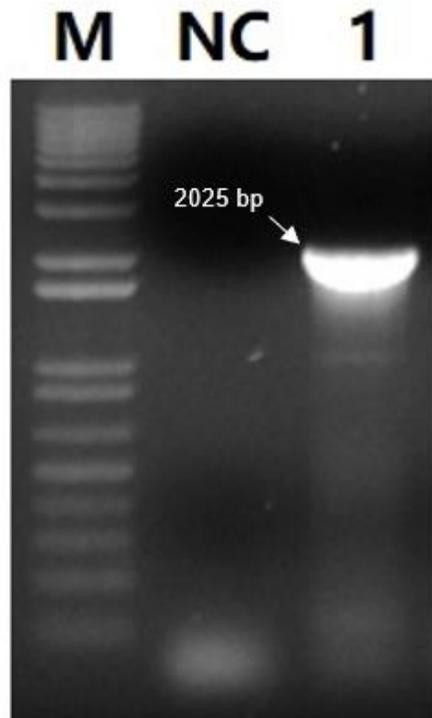


Figure S1. Size confirmation of Katushka gene. PCR product of Katushka gene amplification was migrated in agarose gel by electrophoresis. M – Marker 1kb plus DNA ladder (Promega); NC – Negative Control; 1 – Katushka gene amplification with the respective size.

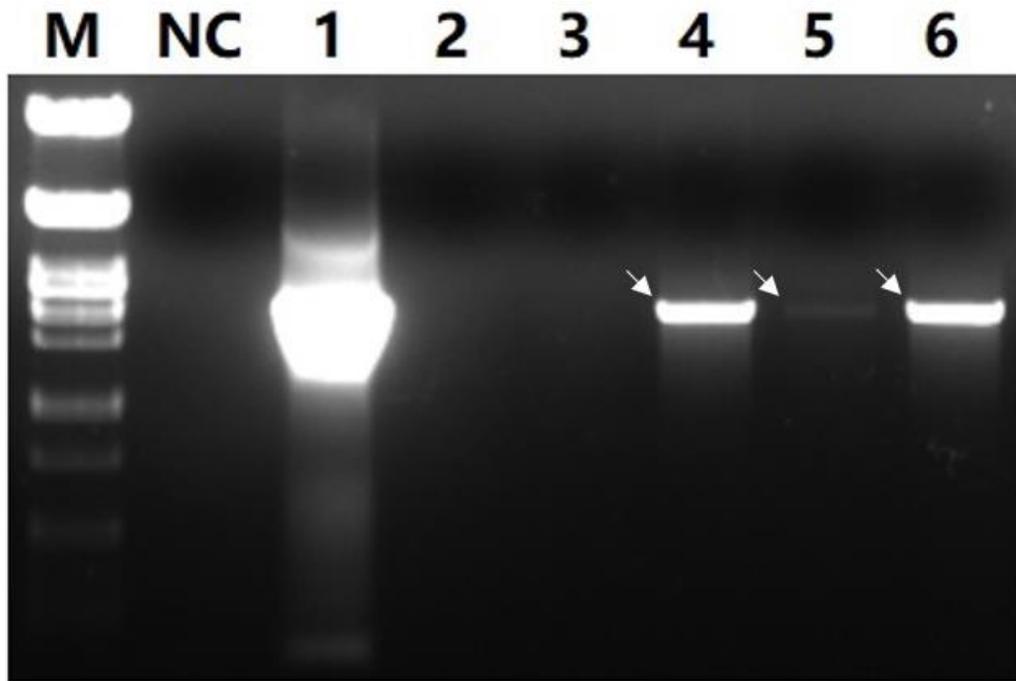


Figure S2. Confirmation of mutants harboring the β -tubulin (1000 bp) promoter. DNA was extracted from mutants and amplified with primers specific for the promoter size. M – Marker lambda DNA ladder; NC – Negative Control; 1 – Positive Control (Plasmid used in transformation); 2 – WT DNA used as template; 3 – gpdA-Kat.10 DNA used as template; 4 - pMANI_018534(1000bp).1; 5 - pMANI_018534(1000bp).2; 6 - pMANI_018534(1000bp).3. Positive mutants are indicated with an arrow.

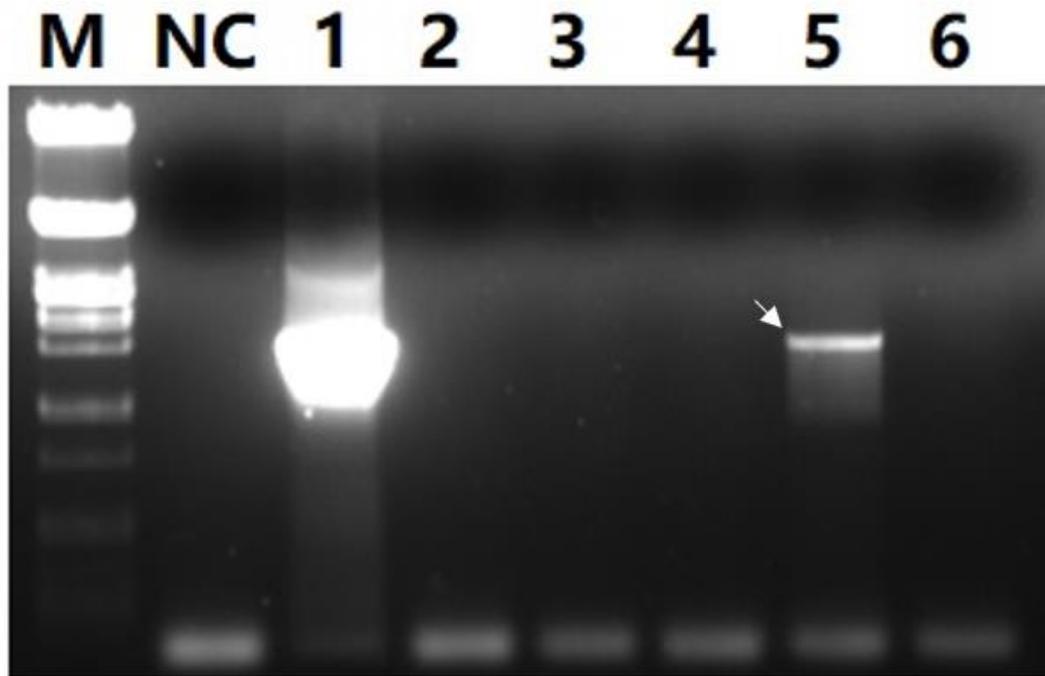


Figure S3. Confirmation of mutants harboring the β -tubulin (500 bp) promoter.

DNA was extracted from mutants and amplified with primers specific for the promoter size. M – Marker lambda DNA ladder; NC – Negative Control; 1 – Positive Control (Plasmid used in transformation); 2 – WT DNA used as template; 3 – gpdA-Kat.10 DNA used as template; 4 - pMANI_018534(500bp).1; 5 - pMANI_018534(500bp).2; 6 - pMANI_018534(500bp).3. Positive mutants are indicated with an arrow.

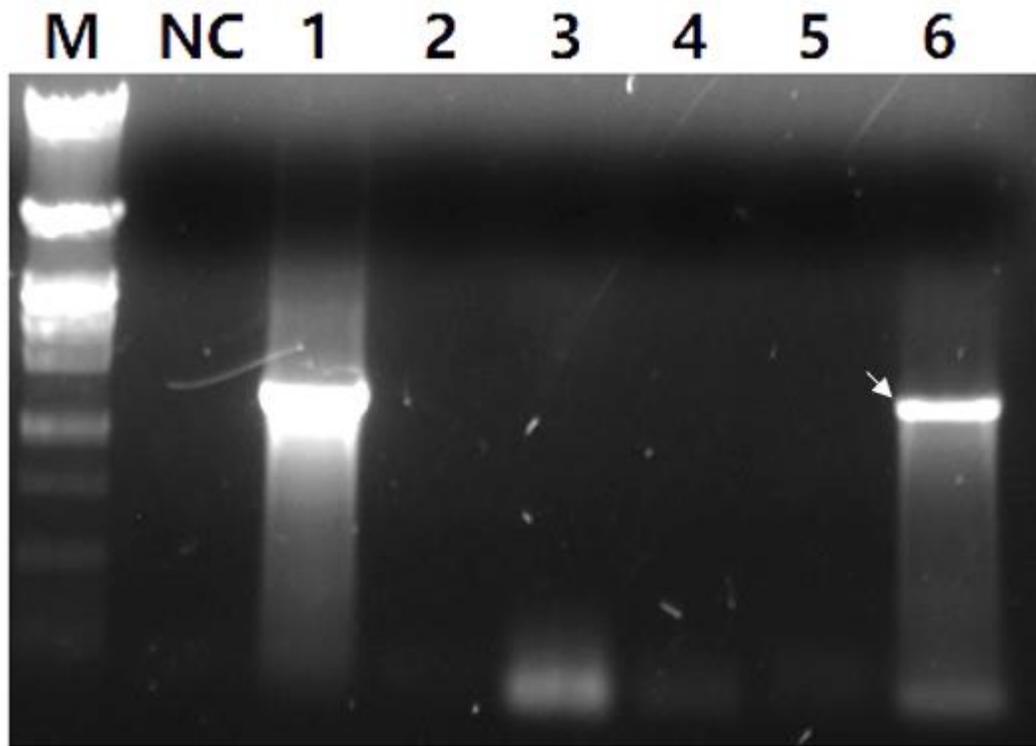


Figure S4. Confirmation of mutants harboring the *gpdMa* (750 bp) promoter.

DNA was extracted from mutants and amplified with primers specific for the promoter size. M – Marker lambda DNA ladder; NC – Negative Control; 1 – Positive Control (Plasmid used in transformation); 2 – WT DNA used as template; 3 – *gpdA-Kat.10* DNA used as template; 4 - pMANI_017852(750bp).1; 5 - pMANI_017852(750bp).2; 6 - pMANI_017852(750bp).3. Positive mutants are indicated with an arrow.

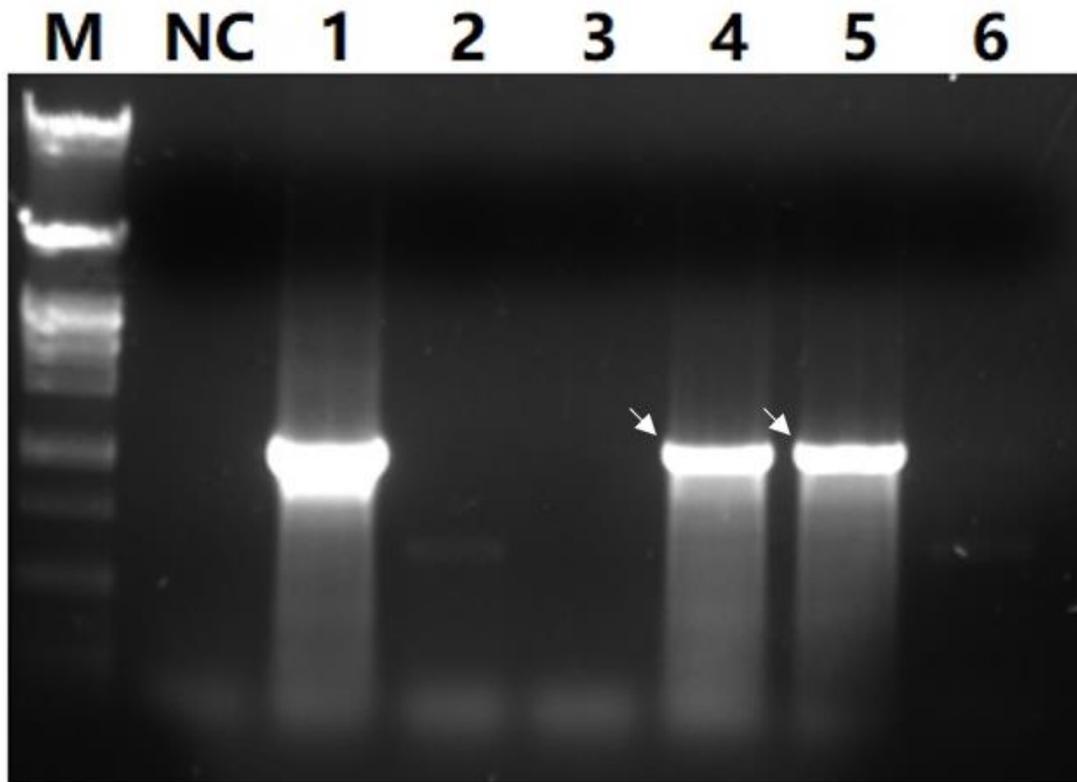


Figure S5. Confirmation of mutants harboring the *gpdMa* (500 bp) promoter.

DNA was extracted from mutants and amplified with primers specific for the promoter size. M – Marker lambda DNA ladder; NC – Negative Control; 1 – Positive Control (Plasmid used in transformation); 2 – WT DNA used as template; 3 – *gpdA-Kat.10* DNA used as template; 4 - pMANI_017852(500bp).1; 5 - pMANI_017852(500bp).2; 6 - pMANI_017852(500bp).3. Positive mutants are indicated with an arrow.

4. DISCUSSÃO GERAL

O uso de pesticidas químicos tem impactado enormemente o meio ambiente e a saúde humana, animal e das plantas (Xiao *et al.*, 2017). Apesar do espectro neurotoxicológico de inseticidas ser seletivo para insetos, diversos destes possuem mecanismos de ação que têm o potencial de atuar em mamíferos, como os bloqueadores de canais de sódio. Ainda que a neurotoxicidade aguda de inseticidas para humanos esteja bem estabelecida, os danos da exposição crônica a doses baixas, ambientais ou durante a aplicação do produto, continuam dúbios, principalmente pelas dificuldades associadas a esse tipo de avaliação (Cassereau *et al.*, 2017). Os danos colaterais do uso de inseticidas químicos para espécies nativas também têm gerado preocupação. Um estudo de 20 anos de acompanhamento de uma área de proteção na Itália aferiu a redução da biodiversidade de pequenos mamíferos ao aumento do uso de herbicidas e inseticidas químicos (Balestrieri *et al.*, 2019). Outro grave problema do uso deste tipo de pesticida é o surgimento de pragas resistentes. Diversos casos já foram relatados na literatura de pragas como *H. armigera* e *S. frugiperda* resistentes a vários inseticidas químicos (Tay *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2018)

O uso de inimigos naturais para controlar espécies praga não é recente. Entretanto, é uma estratégia ambientalmente mais amigável que se baseia na introdução de uma espécie nativa ou exógena que exercerá alguma interação ecológica com a praga (Ex. predação, parasitismo, patogênese, etc). Dentro do vasto repertório de opções de controle biológico, fungos entomopatogênicos possuem um elevado potencial de controlar populações de artrópodes, uma vez que seus esporos são de fácil aplicação no campo, e existem espécies que apresentam alta seletividade (especialistas), evitando, assim, desbalanços ecológicos (Webster *et al.*, 2015).

Fungos do gênero *Metarhizium* apresentam elevada segurança humano-animal, e já são utilizados para o controle de populações de artrópodes há mais de cem anos (Zimmerman, 2007). Ainda que diversos formulações comerciais à base de esporos de fungos entomopatogênicos estejam disponíveis no mercado, existe uma forte relutância por parte dos agricultores em adotarem este tipo de prática, principalmente devido ao maior tempo necessário para controlar a praga, maior frequência de aplicação do produto

e condições específicas para que o fungo se desenvolva corretamente (Ex. temperatura, humidade, radiação UV, etc) (Faria & Wraight, 2007). No entanto formulações de *Metarhizium* já foram utilizadas para controlar o avanço de uma praga de gafanhotos vermelhos na Tanzânia, e existem empresas desenvolvendo novas tecnologias, como formulações oleosas que permanecem mais tempo no ambiente, para a prevenção de pragas na China (Wang & St Leger, 2010). Não obstante, o controle biológico é considerado como uma das prioridades em programas de Controle Integrado de Pragas (Stenberg, 2017).

A manipulação genética surgiu como uma ferramenta de enorme potencial para a geração de linhagens fúngicas que sejam capazes de competir diretamente com inseticidas químicos. A estratégia clássica envolve o estudo, por genética funcional, de fatores de virulência que confirmam maior letalidade ou maior resistência à fatores abióticos para as espécies fúngicas, de maneira a facilitar a seleção artificial de linhagens mais eficientes (Schrank & Vainstein, 2010). No entanto, em anos recentes, a expressão heteróloga e controlada de peptídeos tóxicos em fungos entomopatogênicos, em especial em *Metarhizium*, tem apresentado resultados bastante satisfatórios. Em 2007, a expressão da toxina inseticida de escorpião AaIT em *M. anisopliae* diminuiu em até 22 vezes o número de conídios necessários para causar a mesma mortalidade que a linhagem selvagem em lagartas de *M. sexta* e larvas de *A. aegypti* (Wang & St Leger, 2007). Testes em sistemas de simulação de campo aberto já foram realizados com linhagens transgênicas de *Metarhizium* para o combate de mosquitos transmissores da malária, apresentando 75% de mortalidade de mosquitos infectados com a linhagem transgênica, além de reduzir a propensão destes mosquitos a se alimentarem de sangue (Lovett *et al.*, 2019).

Ainda que estes resultados sejam promissores, é de extrema importância considerar os impactos que a liberação de organismos transgênicos pode acarretar para o meio ambiente (Nakazato *et al.*, 2006; French, 2019). A transferência horizontal de genes é um evento comum em fungos filamentosos, e pode levar a passagem de genes codificantes de toxinas, como o AaIT, de fungos especialistas para fungos generalistas, aumentando o espectro de ação indesejado e potencialmente levando a perdas de

biodiversidade (Fitzpatrick, 2012). Portanto, é essencial o desenvolvimento de estratégias de controle e monitoramento de linhagens transgênicas de fungos entomopatogênicos ainda na fase de pesquisa, para que os mecanismos de disseminação e evolução das espécies introduzidas no ambiente sejam melhor compreendidos.

Seja para o estudo da interação parasita-hospedeiro, para a engenharia genética no desenvolvimento de linhagens entomopatogênicas competitivas, ou para o monitoramento da disseminação ambiental de linhagens transgênicas, é necessário a padronização de ferramentas moleculares para a manipulação genética e rápida identificação destes organismos. Dentre estas ferramentas, o uso de proteínas repórteres, como GFP, é amplamente disseminado para fins diversos. Proteínas GFP-*like* apresentam características visuais que permitem marcações moleculares de fácil identificação, e já foram utilizadas em *Metarhizium*, por exemplo, para o estudo da interação entre parasita e hospedeiro (Barelli *et al.*, 2018), para a descoberta de novos promotores (Nakazato *et al.*, 2006; Kanjo *et al.*, 2019) e para a análise da disseminação e da evolução de linhagens transgênicas introduzidas no ambiente (Wang *et al.*, 2011). No entanto, devido ao comprimento de onda em que a maioria das proteínas GFP-*like* emitem fluorescência, existe um desvio do sinal de fluorescência que pode ser acarretado por diversos fatores, como autofluorescência do fungo e/ou do hospedeiro, absorção da fluorescência por componentes endógenos do hospedeiro ou espalhamento da luz (Wu & Warren, 1984; Andreu *et al.*, 2011).

A proteína fluorescente *far-red* Katushka é a uma alternativa importante e pouco explorada para estudos e metodologias que necessitem de *gene-reporters* para a marcação e quantificação analítica, através de tecidos vivos, de genes, proteínas, organelas, tecidos, entre outros (Shcherbo *et al.*, 2007; Chudakov *et al.*, 2010). Dessa maneira, a padronização da expressão de Katushka no fungo entomopatogênico *M. anisopliae* oferece vantagens sobre as demais FP disponíveis.

Para que estudos envolvendo a expressão de FP sejam confiáveis e reprodutíveis, é importante que as mesmas não apresentem toxicidade para o fungo. Já foi relatado na literatura que o acúmulo de algumas FP na célula pode levar a toxicidade celular, em parte causada pelo consequente acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS)

(Chudakov *et al.*, 2010; Ganini *et al.*, 2017). No entanto, no presente trabalho, a região codificante (CDS) de Katushka foi expressa sob controle do promotor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gpdA), de *A. nidulans*, um promotor forte e constitutivo que já foi demonstrado por produzir altos níveis de transcritos de GFP em *M. anisopliae* (Cao *et al.*, 2007). Ainda assim, os mutantes não apresentaram mudanças fenotípicas e cresceram normalmente nos meios de cultura. O *cassette* de expressão de Katushka, composto pelo promotor gpdA, CDS de Katushka, e terminador TrpC, também de *A. nidulans* (gpdA::Kat::Trpc), se mostrou estável no genoma, uma vez que a fluorescência continuou a ser detectada após consecutivos ciclos de repique (>5) dos mutantes em meio de cultivo rico (MCc) sem agente de seleção.

O ensaio de virulência em larvas de *Tenebrio molitor* também demonstrou que nenhum dos quatro mutantes expressando Katushka tiveram alterações significativas na virulência em relação a linhagem selvagem (WT). A não alteração do fenótipo é essencial para a utilização de *gene-reporters* para o estudo da interação entre parasita e hospedeiro, por exemplo, bem como para estudar com precisão a disseminação espacial de linhagens transgênicas liberadas no ambiente. Ainda, foi demonstrado que é possível detectar a fluorescência de Katushka *in vivo* após o ciclo completo de infecção do fungo, que somado aos demais resultados, caracterizam Katushka como um eficiente *gene-reporter* para o estudo e consequente desenvolvimento de linhagens mais eficientes de *M. anisopliae*.

O uso do promotor gpdA para a expressão heteróloga em fungos filamentosos já é bem consolidado (St Leger *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2012). Este promotor contém 2305 pares de base (pb) e produz altos níveis de transcritos. No entanto, a caracterização do mesmo promotor, mas endógeno, nos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *M. acridum* apresentou atividade significativamente maior nos seu respectivo organismo do que o promotor gpdA (Liao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2012). Assim sendo, o uso de promotores endógenos para controlar a expressão de genes heterólogos apresenta vantagens, e se deve, provavelmente, a evolução concomitante da maquinaria de transcrição e tradução do organismo e de seus promotores. Apesar disso, são escassas as opções de promotores endógenos de *M. anisopliae* disponíveis na literatura

(Nakazato *et al.*, 2006; Kanjo *et al.*, 2019). Outro aspecto a se considerar diz respeito ao tamanho do promotor. A construção de *cassettes* e vetores de expressão requerem a manipulação e clonagem de fragmentos de DNA e plasmídeos. Fragmentos e vetores de tamanho elevado apresentam maiores dificuldades para se trabalhar com, como menores eficiências em técnicas de manipulação do DNA e transformação genética. Portanto, promotores de tamanho reduzido são preferíveis (Kanjo *et al.*, 2019).

A fim de aumentar o repertório de promotores endógenos, preferencialmente curtos, de *M. anisopliae*, o mesmo protocolo utilizado para a geração dos mutantes *gpdA::Kat::TrpC* foi empregado, substituindo o promotor *gpdA* por sequências de diferentes tamanhos obtidas à montante de genes *housekeeping* de *M. anisopliae*. Para tanto, foram construídos 11 vetores de transformação, sendo eles referentes aos genes: β -tubulina (1000 pb, 750 pb, 500 pb); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpdMa*) (1000 pb, 750 pb, 500 pb); gamma-actina (1000 pb, 750 pb, 500 pb); e *trp1* (510 pb, 300 pb). Todos os vetores foram transformados de maneira independente em *M. anisopliae*.

O método de *screening* de fluorescência dos mutantes foi realizado em duas etapas: (i) o *screening* qualitativo rápido pela análise de imagem FLoid Cell, que indicava se havia fluorescência na colônia do mutante; e (ii) o *screening* analítico e quantitativo pelo equipamento IVIS Lumina II. O *screening* qualitativo rápido é uma das vantagens de se utilizar a proteína repórter *Katushka*, uma vez que pode ser realizado em poucos minutos na própria placa de cultivo, sem necessidade de preparar material adicional, e foi responsável por evitar desperdícios de reagente em análises subsequentes pela exclusão de transformantes que não apresentavam o fenótipo de fluorescência mínimo esperado. Transformantes que passavam nesse *screening*, ou seja, apresentavam fluorescência, foram dispostos em meio de cultura sólido, juntamente com os mutantes confirmados *gpdA::Kat::TrpC*, e a linhagem WT, em uma mesma placa, para comparar quantitativamente a fluorescência pelo IVIS Lumina II, já que este equipamento é capaz de subtrair a fluorescência de *background*, incluindo a autofluorescência do fungo (subtraída pela comparação com a WT) da fluorescência real do *gene-reporter*. O resultado desta análise indicou que diferentes tamanhos dos promotores eram capazes ou não de promover a expressão de *Katushka*.

No entanto, para confirmar se as construções haviam sido corretamente inseridas no genoma de *M. anisopliae*, foi extraído DNA dos 33 transformantes que foram identificados no *screening* no IVIS Lumina II (três para cada construção) e a confirmação foi feita por duas reações independentes de PCR: (i) com *primers* específicos para cada uma das 11 construções (confirmação positiva), respectivamente; e (ii) com *primers* específicos para a construção *gpdA::Kat::TrpC* (confirmação negativa). Desta etapa, foram confirmados mutantes das construções de promotor da β -tubulina (três mutantes 1.000 pb e um 500 pb) e de *gpdMa* (um mutante 750 bp e dois mutantes 500 pb), os quais foram incluídos no artigo científico para publicação. Enquanto os mutantes com promotores da β -tubulina apresentaram níveis de fluorescência equiparáveis aos mutantes *gpdA::Kat::TrpC*, nenhum dos mutantes *gpdMa* apresentou fluorescência no *screening* no IVIS Lumina. Notavelmente, promotores homólogos ao *gpdMa* foram descritos em *Beauveria bassiana* e *M. acridum* com 1153 e 1463 pares de base, respectivamente, e versões menores destes promotores reduziram sua atividade, potencialmente devido à perda de sequências regulatórias (Liao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2012). Tal fenômeno pode ter sido a causa destes mutantes terem passado no *screening* qualitativo, mas não no quantitativo.

O que chamou a atenção foi que transformantes das construções da gamma-actina apresentaram forte fluorescência no *screening* quantitativo realizado no IVIS Lumina II, mas não apresentaram amplificação em nenhuma das duas confirmações por PCR (dados não apresentados). Estes mesmos transformantes perderam a capacidade de se desenvolver sobre o agente de seleção utilizado e apresentaram perda de fenótipo de fluorescência, potencialmente indicando a instabilidade mitótica deste *cassette* ou do local onde ele foi inserido. Tanto esses quanto os transformantes da construção com o promotor *P_{trp1}* não foram incluídos no artigo científico para publicação, pois ainda são necessárias novas rodadas de transformação para obter mutantes positivos. Todas as 11 construções dos vetores foram confirmadas por clivagem com enzimas de restrição e por PCR, previamente à transformação genética.

Em suma, novas ferramentas para o estudo do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foram desenvolvidas neste trabalho. A padronização do *gene-reporter* *Katushka* em *M.*

anisopliae abre novas frentes de estudo uma vez que apresenta diversas vantagens em consideração a GFP, que somadas aos promotores de tamanho reduzido de 1000 pb e 500 pb de β -tubulina descritos, auxiliarão no desenvolvimento de micoinseticidas capazes de competir com pesticidas químicos no controle de pragas. Mais estudos são necessários para aferir com maior clareza quais são os elementos regulatórios presentes nas sequências promotoras descritas a fim de desenvolver promotores otimizados para *M. anisopliae*. Entre outras perspectivas para este trabalho incluem o acompanhamento do processo de infecção *in vivo* por meio da fluorescência de Katushka, e análises de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para avaliar a força relativa dos promotores descritos com promotores como o *gpdA*, entre outros. O protocolo padronizado para o *screening* de sequências promotoras endógenas neste trabalho pode ser facilmente adaptado para promotores diversos, de diferentes forças ou induzíveis por diferentes estímulos, com o objetivo de diversificar o repertório de promotores eficientes para a expressão heteróloga em *M. anisopliae*.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, Mar. 2014.

ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 493-500, Dez. 2016.

ANDREU, N.; ZELMER, A.; WILES, S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 2, p. 360–394, Mar. 2011.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

AW, S.; HUE, S. M. Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. **J Fungi**, v. 3, n. 2, Jun. 2017.

BAESHEN, N. A. et al. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, p. 1–9, Out. 2014.

BAGGA, S. et al. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159–169, Jan. 2004.

BALESTRIERI, A. et al. Long-term impact of agricultural practices on the diversity of small mammal communities: a case study based on owl pellets. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, n. 12, p. 725, Nov. 2019.

BARELLI, L.; MOREIRA, C. C.; BIDOCHKA, M. J. Initial stages of endophytic colonization by *metarhizium* involves Rhizoplane colonization. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 12, p. 1531–1540, Dez. 2018.

BEYS DA SILVA, W. O. et al. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biol**, v. 114, n. 1, p. 10–15, Jan. 2010.

BISCHOFF, J. F.; REHNER S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-30, Jun. 2009.

BLAZECK, J.; ALPER, H. S. Promoter engineering: Recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 46-58, Jan. 2013.

BOKMAN, H.; WARD, W. Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 101, n. 4, p. 1372–1380, Ago. 1981.

BOUCIAS, D. G; PENDLAND, J. C. Attachment of Mycopathogens to Cuticle. In: G. T. COLE, G. T. et al. (eds). **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Springer Science, 1991. cap.5, p.101-127.

BRIDGE, P. D. et al. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. **Biodiversity & Conservation**, v. 6, n. 2, p. 177–189, Fev. 1997.

BUTT, T. M. et al. *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. **Plos One**. v. 8, n. 12, Dez. 2013.

CAO, Y. et al. Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 6, p. 907–911, Jun. 2007.

CAO, Y.; JIAO, R.; XIA, Y. A strong promoter, *PMagpd*, provides a tool for high gene expression in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 3, p. 557–562, Mar. 2012.

CALIPER LIFE SCIENCES. **IVIS Lumina II**. Massachussets, EUA. Disponível em: <<http://www.caliperls.com/assets/014/7156.pdf>>, Acesso em: 20 nov. 2019.

CASSEREAU, J. et al. Neurotoxicity of Insecticides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2988-3001, Mar. 2017.

CAVALLIUS, J. et al. Site-directed Mutagenesis of Yeast eEF1A: Viable Mutants with Altered Site-directed Nucleotide Specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28752-28758, Out. 1998.

CHALFIE, M. et al. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Fev. 1994.

CHOUVENC, T.; SU, N. Y.; ROBERT, A. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 3, p. 234–241, Jul. 2009.

CHUDAKOV, D. M.; MATZ, M. V.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K. A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103–1163, Jul. 2010.

COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 70, n. 11, p. 3240–3244, Nov. 1973.

CONTAG, C. H. et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 593–603, Nov. 1995.

CORY, J. S.; FRANKLIN, M. T. Evolution and the microbial control of insects. **Ecological Applications**, v. 5, n. 5, p. 455-469, Mai. 2012.

CRUZ, I. et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal Of Pest Management**, v. 45. p. 293-296, Out. 1999.

DEANER, M.; ALPER, H. S. Promoter and Terminator Discovery and Engineering. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 162, p. 21-44. Ago. 2016.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, Mai. 2009.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, Fev. 2000.

EMBRAPA, 2013. **Pesquisadores formam linha de frente para controla da *helicoverpa armígera***. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1495179/pesquisadores-formam-linha-de-frente-para-controle-da-helicoverpa-armigera>>, Acesso em: 20 nov. 2019.

EVDOKIMOV, A. G. et al. Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. **EMBO Rep.** v. 7, n. 10, Out. 2006.

FAN, Y. et al. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 295–302, Nov. 2007.

FARIA, M. R. D.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPIN, J.; CORSHERO, J. L.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1–8, Mar. 2009.

FIGUEIREDO, N. V. et al. **Utilização de métodos de bioimagem para a análise ex vivo da infecção causada por *Cryptococcus gattii***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FITZPATRICK, D. A. Horizontal gene transfer in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 329, n. 1, p. 1–8, Abr. 2012.

FLINT, M. L. et al. **Natural enemies handbook: the illustrated guide to biological pest control**. Oakland: University of California Press, 1998.

FRENCH, K. E. Harnessing synthetic biology for sustainable development. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 4, p. 250–252, Abr. 2019.

GANINI, D. et al. Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. **Redox Biology**, v. 12, p. 462–468, Mar. 2017.

GRIJALBA, E. P. et al. *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity under glasshouse conditions. **Fungal Biology**, v. 122, n. 11, p. 1069–1076, Nov. 2018.

GUTIÉRREZ-MORENO, R. et al. Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 2, p. 792-802, Oct. 2018.

HABERLE, V.; LENHARD, B. Promoter Architectures and Developmental Gene Regulation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 57, p. 11-23. Set. 2016.

HABERLE, V.; STARK, A. Europe PMC Funders Group Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 10, p. 621–637, Out. 2018.

HE, M.; HU, J.; XIA, Y. Large scale expressed sequence tag (EST) analysis of *Metarhizium acridum* infecting *Locusta migratoria* reveals multiple strategies for fungal adaptation to the host cuticle. **Current Genetics**, v. 58, n. 5-6, p. 265–279, Dez. 2012.

HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5260–5266, Set. 2005.

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proceedings of the royal society B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1502, p. 1811–1819, Set. 2002.

JUNGES, A. **As quitinases de *Metarhizium anisopliae*: caracterização genômica e funcional**. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

KADONAGA, J. T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 40-51, Fev. 2012.

KANJO, K. et al. Truncated, strong inducible promoter P mcl1 from *Metarhizium anisopliae*. **3 Biotech**, v. 9, n. 3, p. 75, Mar. 2019.

KEPLER, R. M.; REHNER, S. A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 2, p. 210–217, Mar. 2013.

KLUGE, J.; TERFEHR, D.; KÜCK, U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6357–6372, Ago. 2018.

KONIG, K. Multiphoton microscopy in life sciences in Life Sciences. **Journal of Microscopy**, v. 200, n. Pt. 2, p. 83-104, Nov. 2000.

KUO, CY; CHOU, S. Y.; HUANG, C. T. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the gpd promoter for transformation in *Flammulina velutipes*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 593–599, Out. 2004.

LEAL, S. C. M. et al. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**, v. 98, n. 9, p. 1077–1081, Set. 1994.

LEAL, S. C. M. et al. Amplification and restriction endonuclease digestion of the Pr1 gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. **Mycological Research**, v. 101, n. 3, p. 257–265, Mar. 1997.

LEÃO, M. P. C. et al. Differential expression of the pr1A gene in *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium acridum* across different culture conditions and during pathogenesis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 86–92, Mar. 2015.

LEBLOND, F. et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 98, n. 1, p. 77–94, Jan. 2010.

LEITE, N. A.; MENDES, S. M.; AMAYA, O. F. S.; SANTOS, C. A.; TEXEIRA, T. P. M.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, n. 3, p. 236–247, Set. 2015.

LEVICK, B.; SOUTH, A.; HASTINGS, I. M. A Two-Locus Model of the Evolution of Insecticide Resistance to Inform and Optimise Public Health Insecticide Deployment Strategies. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 1, Jan. 2017.

LI, T. et al. Engineering of core promoter regions enables the construction of constitutive and inducible promoters in *Halomonas* sp. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 219–227, Fev. 2016.

LIAO, X. G. et al. Characterization of a highly active promoter, PBbgpd, in *Beauveria bassiana*. **Current Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 121–126, Ago. 2008.

LIU, C. M.; HUANG, S. S.; TZENG, Y. M. Analysis of Destruxins Produced from *Metarhizium anisopliae* by Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 3, p. 140–144, Mar. 2004.

LIU, C. M.; HUANG, S. S.; TZENG, Y. M. Purification and Quantitative Analysis of Destruxins from *Metarhizium anisopliae* by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 6, p. 1013-1025, Ago. 2007.

LOENING, A. M.; FENN, T. D.; GAMBHIR, S. S. Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 374, n. 4, p. 1017–1028, Dez. 2007.

LOVETT, B. et al. Transgenic *Metarhizium* rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. **Science**, v. 364, n. 6443, p. 894–897, Mar. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Prêmio Nobel de química 2006**. Química Nova na Escola, v. 24, p. 3–6, 2006.

MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. **Mycological Research**, v. 102, n. 10, p. 1233–1241, 1998.

MENT, D. et al. Novel Technique for Quantifying Adhesion of *Metarhizium anisopliae* Conidia to the Tick Cuticle. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3521–3528, Jun. 2010.

MENT, D. et al. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 1570-1583, Jun. 2012.

MENT, D. et al. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23 n. 8, p. 956-967, Nov. 2013.

MERZLYAK, E. M. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. **Nature Methods**, v. 4, n. 7, p. 555–557, Jul. 2007.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances Journal**, v. 26, n. 2, p. 177–185, Mar. 2008.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, Jul. 2017.

MOHAMMADI, A.; BAHRAMIKIA, S. Molecular identification and genetic variation of *Alternaria* species isolated from tomatoes using ITS1 sequencing and inter simple sequence repeat methods. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 2, p. 1–8, Jun. 2019.

NAKAZATO, L. et al. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1* α homologous promoter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 521–528, Set. 2006.

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Grooming Capacity Inhibition in *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) Inoculated with Entomopathogenic Fungi and Treated with Imidacloprid. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 29, n. 3, p. 537–546, Set. 2000.

OKUMA, D. M. et al. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, n.6, p. 1441–1448, Jun. 2018.

OLIVEIRA, N. S. **Análise Funcional de Genes Putativos da Família GH18 de Glicosil Hidrolases no Fungo Entomopatogênico *Metarhizium Anisopliae***. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PADDON, C. J. et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 486, p. 528-532, Abr. 2013.

PAL, S.; WU, L. P.; ST LEGER, R. J. Fungal Peptide Destruxin A Plays a Specific Role in Suppressing the Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969–8977, Mar. 2007.

PAKSHIR, K. et al. Molecular identification of non- *Cryptococcus* yeasts associated with pigeon droppings in Shiraz, Southern Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 3, p. 204–208, Fev. 2019.

PARRA, J. R. P. et al. *Trichogramma* as a Tool for IPM in Brazil. In: VOLOSCIUK, L. F. et al. **Biological Control of Pests Using *Trichogramma*: Current Status and Perspectives**. Northwest A&F University Press, 2015. Cap.20, p. 472-496.

PETERSEN, J. et al. The 2.0-Å Crystal Structure of eqFP611, a Far-Red Fluorescent Protein from the Sea Anemone *Entacmaea quadricolor*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44626-44631, Nov. 2003.

PRASHER, D. C. et al. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. **Gene Journal**, v. 111, n. 2, p. 229–233, Fev. 1992.

RANGANATHAN, R.; WALL, M. A.; SOCOLICH, M. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 12, p. 1133–1138, Dez. 2000.

REDDEN, H.; ALPER, H. S. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, Jul. 2015.

ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; EVANS, H. C.. Metarhizium album, a fungal pathogen of leaf- and planthoppers. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 451-459, 1987.

SANTI, L. et al. Metarhizium anisopliae host – pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biol**, v. 114, n. 4, p. 312–319, Abr. 2010.

SANTI, L. et al. Conidial surface proteins of Metarhizium anisopliae: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874–880, Abr. 2010.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267–1274, Dez. 2010.

SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2083–2094, Dez. 2009.

SHCHERBO, D. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. **Nature Methods**, v. 4, n. 9, p. 741–746, Set. 2007.

SHLYUEVA, D.; STAMPFEL, G.; STARK, A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 4, p. 272–286, Abr. 2014.

SMALE, S. T.; KADONAGA, J. T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 449–479, Mar. 2003.

SPITZ, F.; FURLONG, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 9, p. 613–626, Set. 2012.

ST LEGER, R. J. et al. Genetic Differences in Allozymes and in Formation of Infection Structures among Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, n. 1, p. 89-101, Jul. 1992.

ST LEGER, R. et al. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6349–6354, Jun. 1996.

ST LEGER, R. J. S.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 901–907, Jan. 2010.

STENBERG, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 759–769, Set. 2017.

STRUHL, K. Constitutive and Inducible *Saccharomyces cerevisiae* Promoters: Evidence for Two Distinct Molecular Mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 11, p. 3847–3853, Nov. 1986.

TAY, W. T. et al. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 4–11, Nov. 2019.

THOMAS, M. C.; CHIANG, C. The General Transcription Machinery and General Cofactors. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 105–178, Mai. 2006.

TOMER, H. et al. Activity of native and commercial strains of *Metarhizium* spp. against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* under different environmental conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 262, n. September, p. 20–25, Oct. 2018.

TRAGUST, S. et al. Ants Disinfect Fungus-Exposed Brood by Oral Uptake and Spread of Their Poison. **Current Biology**, v. 23, n. 1, p. 76–82, Jan. 2013.

TROY, T. et al. Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models. **Mol Imaging**, v. 3, n. 1, p. 9–23, Jan. 2004.

TULLOCH, M. Genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976.

VANHERP, L. et al. Bronchoscopic fibered confocal fluorescence microscopy for longitudinal in vivo assessment of pulmonary fungal infections in free-breathing mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, Fev. 2018.

VERKHUSHA, V. V. et al. Accelerated Publications High Stability of *Discosoma* DsRed As Compared to *Aequorea* EGFP. **Biochemistry**, v. 42, n. 26, p. 7879–7884, Jun. 2003.

VILCINSKAS, A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 2016-214, Mai. 2010.

VILCINSKAS, A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal Of Insect Physiology**, v. 59, n. 2, p. 123-9, Fev. 2013.

WANG, C.; DUAN, Z.; LEGER, R. J. S. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* Is Required for Adaptation to Insect Host Hemolymph. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 2, p. 302–309, Fev. 2008.

WANG, C.; LEGER, R. J. S. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6647-6652, Abr. 2006.

WANG, C.; LEGER, R. J. S. The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, p. 808–816, Mai, 2007.

WANG, C.; LEGER, R. J. S. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 1455–1456, Dez. 2007.

WANG, C.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterisation of pr1 virulent gene in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, p. 251–255, Ago. 2002.

WANG, S. et al. Local adaptation of an introduced transgenic insect fungal pathogen due to new beneficial mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 51, p. 20449–20454, Dez. 2011.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1119–1139, Set. 2012.

WEBSTER, A. et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3–4, p. 302–308, Jan. 2015.

WOSTEN, H. A. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 625-646. 2001.

WU, C. H.; WARREN, H. L. Natural Autofluorescence in Fungi, and Its Correlation with Viability. **Mycologia**, v. 76, n. 6, p. 1049–1058, 1984.

YAGINUMA, D.; HIROMORI, H.; HATSUKADE, M. Relationship between Virulence and Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria amorpha* (Strain: HpBa-1) to the Yellowish Elongate Chafer, *Heptophylla picea* (Motschulsky) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 48, n. 2, p. 101-108. Jan. 2004.

YANG, Y.; YAPENG, L.; YIDONG, W. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**. v. 106, n. 1, p. 375–381, 2013.

YI LIU, Z. et al. *Cordyceps brittlebankisoides*, a New Pathogen of Grubs and Its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 3, p. 178–182, Out. 2001.

YIP, H. Y.; RATH, A. C.; KOEN, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adophorus couloni*). **Mycological Research**, v. 96, n. 2, p. 92–96, Fev. 1992.

YU, Y. A. et al. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 313–321, Mar. 2004.

YUN, T.; PARK, S.; YU, J.; HWANG, Y.; HONG, K. Isolation and Identification of Fungal Species from the Insect Pest *Tribolium castaneum* in Rice Processing Complexes in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 5, p. 356–366, Out. 2018.

XIAO, X.; CLARK, J. M.; PARK, Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. **Food Chem Toxicol**, v. 105, p. 456–474, Jul. 2017.

ZHANG, C.; XIA, Y. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. **Current Genetics**, v. 55, n. 4, p. 399–407, Ago. 2009.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, Out. 2007.