

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

**AS QUITINASES DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*:
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FUNCIONAL**

Tese de Doutorado

ÂNGELA JUNGES

Porto Alegre, setembro de 2014

**As quitinases de *Metarhizium anisopliae*:
caracterização genômica e funcional**

ÂNGELA JUNGES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientadora: Prof. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, setembro de 2014.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação dos Professores Doutores **AUGUSTO SCHRANK** e **MARILENE HENNING VAINSTEIN**, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq e da Fundação de Amparo a Pesquisa do RS FAPERGS, no **LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE FUNGOS FILAMENTOSOS** do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Para *Vitor*

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Augusto Schrank e Marilene Vainstein pelo suporte, pela confiança que depositaram em mim, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Nossa convivência ao longo desses dez anos me fez admirá-los profissional e pessoalmente.

Ao Charley e a Lívia, agradeço por todo o suporte que me foi oferecido desde a minha iniciação científica; pelos ensinamentos transmitidos, por todo apoio que recebi sempre que precisei, pela confiança e pela amizade.

Ao Charley e ao Juliano Boldo, por terem sido meus mestres desde a iniciação científica e até hoje.

Às queridas Rana e Fran Maboni, pelas inúmeras risadas, conversas, conselhos, jantares, em especial pela amizade; sem os quais esse trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos meus queridos ICs, Nicolau e Thiane, por me ensinarem a ensinar, por me estimularem cientificamente, pela troca de ensinamentos e pela amizade.

Ao Eder, Anelise, Bárbara, Caru, Fran Melise, Amanda, Júlia, Vanessinha, Rafa, Thais, Eliara, Alexia, Alícia, Ane, Leti, Glaci, *et al.* por serem queridões comigo e tornarem meus dias melhores. A todos colegas dos laboratórios 217, 220 e 222, pelos ensinamentos trocados e pelos dias de trabalho divertidos e animadores.

A Silvinha e ao Luciano, pelo auxílio sempre que precisei.

À minha família amada que sempre me apoiou nas minhas escolhas, agradeço por todo suporte e amor que me foi dado.

Ao grande amor da minha vida, Vitor, por estar ao meu lado e me apoiar sempre, por ser tudo o que eu admiro e por me fazer querer ser sempre melhor.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1 Introdução.....	1
1.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> - características gerais, biocontrole e patogenicidade....	2
1.1.1 <i>M. anisopliae</i> apresenta diferentes tipos celulares em seu ciclo de infecção.....	3
1.1.2 <i>M. anisopliae</i> e o biocontrole.....	6
1.1.3 Entomopatogenicidade.....	9
1.2 Quitina - na parede celular fúngica e no exoesqueleto de artrópodes.....	10
1.3 Quitinases.....	11
1.3.1 Classificação das quitinases em subgrupos.....	13
2. Objetivos.....	24
Capítulo 1 – Genomic analyses and transcriptional profiles of glycoside hydrolase	
18 family genes of <i>Metarhizium anisopliae</i> (submetido a revista PLOS ONE em 08/04/14	
aceito em 19/08/14).....	25
Capítulo 2 – Construção de mutantes nulos para as quitinases do subgrupo C em	
<i>Metarhizium anisopliae</i>.	74
2.1 Introdução.....	75
2.2 Material e Métodos.....	77
2.3 Resultados.....	81
2.4 Discussão.....	88
3. Discussão Geral.....	90
4. Conclusões.....	96
5. Perspectivas.....	98
6. Referências.....	99

Lista de Abreviaturas

ATMT	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CBM	Módulo/domínio de ligação a carboidrato (<i>Carbohydrate-Binding Module</i>)
ChBD	Domínio de ligação a quitina (<i>Chitin-Binding Domain</i>)
CBD	Domínio de ligação a celulose/quitina (<i>Cellulose-Binding Domain</i>)
ENGase	Endo-N-acetil-glicosaminidase
Genes GH18	Genes da família 18 das glicosil hidrolases
GH18	Família 18 das glicosil hidrolases
GlcNAc	N-acetilglicosamina
NAGase	N-acetil-glicosaminidase (pertencente a família GH20)
Sg ou sg	Subgrupo

Lista de Tabelas

Tabela da Introdução:

Tabela A: Alguns exemplos de genes/proteínas da família GH18 estudados em diferentes fungos e suas funções preditas.....22

Tabela do Capítulo 1 (artigo submetido a revista PLOS ONE em 08/04/14, aceito em 19/08/2014):

Table 1: Properties of the 24 *M. anisopliae* glycoside hydrolase family 18 genes (GH18 genes).....51

Tabelas Suplementares do Capítulo 1 (artigo):

Table S1: Chitinase survey of the *M. anisopliae* genome: fungi, number of chitinase sequences and source..... 67

Table S2: Oligonucleotide sequences used for RT-PCR and qPCR experiments..... 68

Table S3: Additional properties of the 24 *M. anisopliae* GH18 proteins..... 69

Tabelas do Capítulo 2:

Tabela B: Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores de deleção dos genes de quitinase do sgC79

Tabela C: Número de potenciais transformantes mutantes nulos dentre os transformantes $\Delta C1$, $\Delta C3$ e $\Delta C4$88

Lista de Figuras

Figuras da Introdução:

Figura A: Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> demonstrando os tipos celulares diferenciados conforme as etapas de infecção sobre o carrapato bovino <i>R. microplus</i>	4
Figura B: Estrutura formada pela espécie teleomórfica <i>C. militaris</i> durante a infecção.....	5
Figura C: O espectro de hospedeiros de <i>M. anisopliae</i> inclui pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas.	8
Figura D: Estrutura da quitina e sua presença nas paredes celulares de fungos e no exoesqueleto de artrópodes.....	10
Figura E: Presença de diferentes módulos caracterizam os subgrupos de quitinases	14

Figuras do Capítulo 1 (artigo):

Figure 1: Modular domain structure and transcripts from <i>M. anisopliae</i> GH18 genes.....	52
Figure 2: Phylogenetic relationships among GH18 domain-containing proteins and subgroup divisions in three <i>Metarhizium</i> strains and <i>Cordyceps militaris</i>	53
Figure 3: Phylogenetic tree of GH18 subgroup A chitinases	54
Figure 4: Phylogenetic tree of GH18 subgroup B chitinases	55
Figure 5: Phylogenetic tree of GH18 subgroup C chitinases	56
Figure 6: Phylogenetic tree of the GH18 subgroup D (chitinase) and subgroup E (ENGases).....	57
Figure 7: Relative chitinase and ENGase transcript profiles in <i>M. anisopliae</i>	58
Figure 8: HeatMap and hierarchical clustering of the eight analyzed conditions by similar expression profiles.....	59

Figuras do Material Suplementar do artigo:

Figure S1: <i>M. anisopliae</i> cell types analyzed in this work.....	60
Figure S2: Evolutionary relationships of <i>M. anisopliae</i> , <i>M. robertsii</i> , <i>M. acridum</i> and <i>Cordyceps militaris</i>	61
Figure S3: Categorization of 24 GH18 proteins in the <i>M. anisopliae</i> genome.	62
Figure S4: Presence of the conserved domains S/A/MxGG and DxxDxDxE in <i>M. anisopliae</i> predicted chitinases and ENGases.	63

Figure S5: Conservation of intron positions on sgA paralogous chitinases A5 and A7.	64
Figure S6 (A-D): Relative transcript levels analysis using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and conidia as the control condition.....	67

Figuras do Capítulo 2:

Figura F: Representação esquemática da construção dos <i>cassettes</i> para deleção dos genes de quitinases do sgC em <i>M. anisopliae</i>	78
Figura G: Confirmação da construção dos vetores pPZP:: $\Delta C1$ e pPZP:: $\Delta C2$	82
Figura H: Confirmação da construção dos vetores pPZP:: $\Delta C3$ e pPZP:: $\Delta C4$	84
Figura I: Aspecto fenotípico de algumas colônias de transformantes obtidos nos eventos de agrotransformação.....	86
Figura J: Primeira etapa da detecção de mutantes para os genes <i>chimaC1</i> , <i>C3</i> e <i>C4</i>	87

Resumo

O metabolismo da quitina em fungos envolve diversos processos, tais como a manutenção da parede celular metabolicamente ativa, a nutrição básica e também diferentes aspectos da virulência. Quitinases são enzimas pertencentes às famílias 18 e 19 das glicosil hidrolases (GH18 e GH19) e são responsáveis pela hidrólise das ligações β -1,4 da quitina. Este homopolímero linear composto de unidades de N-acetil-glicosamina é um componente essencial da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes. Inúmeras quitinases foram atribuídas a atividades estruturais, morfogênicas, autolíticas e nutricionais em células fúngicas. No entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, as quitinases também estão envolvidas na virulência. Os genomas de fungos filamentosos exibem um número maior de genes que codificam para quitinases do que os genomas de bactérias ou de leveduras. Uma busca realizada no genoma de *M. anisopliae* identificou 24 genes que pertencem à família 18 das glicosil hidrolases, incluindo os três genes que codificam quitinases previamente determinados e nomeados de *chit1*, *chit2* e *chit3*. Essas quitinases putativas foram classificadas, com base na organização de seus domínios e em análises filogenéticas, nos subgrupos previamente descritos A, B e C e em um novo subgrupo D. Além disso, três outras proteínas GH18 puderam ser classificadas como endo-N-acetil-glicosaminidases putativas, enzimas que estão associadas com deglicosilação e foram, portanto, classificadas em um novo subgrupo E. O perfil transcricional dos genes GH18 foi avaliado por qPCR utilizando RNA extraído de oito diferentes condições de cultivo, representando diferentes estágios de desenvolvimento ou diferentes estados nutricionais. Esses transcritos dos genes GH18 foram detectados em pelo menos um dos diferentes estágios de desenvolvimento de *M. anisopliae* validando, portanto, os genes propostos. Nem todos os membros de um mesmo subgrupo apresentaram padrões iguais de expressão sob as diferentes condições. A determinação das quitinases e ENGases de *M. anisopliae* e um estudo mais detalhado envolvendo o papel dessas enzimas em funções morfológicas ou nutricionais irá permitir um entendimento mais amplo do potencial quitinolítico deste fungo entomopatogênico altamente infectivo. Com o objetivo de avançar no estudo das quitinases de *M. anisopliae*, vetores para a construção de mutantes nulos para os quatro genes de quitinases do sgC foram gerados e, utilizando a metodologia de agrotransformação para fungos, linhagens transformantes foram obtidas. Análises genéticas e fenotípicas múltiplas serão realizadas para avaliar as alterações induzidas pelos mutantes de quitinases do sgC.

Abstract

Fungal chitin metabolism involves diverse processes such as metabolically active cell wall maintenance, basic nutrition, and different aspects of virulence. Chitinases are enzymes belonging to the glycoside hydrolase family 18 (GH18) and 19 (GH19) and are responsible for the hydrolysis of β -1,4-linkages in chitin. This linear homopolymer of N-acetyl- β -D-glucosamine is an essential constituent of fungal cell walls and arthropod exoskeletons. Several chitinases have been directly implicated in structural, morphogenetic, autolytic and nutritional activities of fungal cells. In the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, chitinases are also involved in virulence. Filamentous fungi genomes exhibit a higher number of chitinase-coding genes than bacteria or yeasts. The survey performed in the *M. anisopliae* genome has successfully identified 24 genes belonging to glycoside hydrolase family 18, including three previously experimentally determined chitinase-coding genes named *chit1*, *chi2* and *chi3*. These putative chitinases were classified based on domain organization and phylogenetic analysis into the previously described A, B and C chitinase subgroups, and into a new subgroup D. Moreover, three GH18 proteins could be classified as putative endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidases, enzymes that are associated with deglycosylation and were therefore assigned to a new subgroup E. The transcriptional profile of the GH18 genes was evaluated by qPCR with RNA extracted from eight culture conditions, representing different stages of development or different nutritional states. The transcripts from the GH18 genes were detected in at least one of the different *M. anisopliae* developmental stages, thus validating the proposed genes. Moreover, not all members from the same chitinase subgroup presented equal patterns of transcript expression under the eight distinct conditions studied. The determination of *M. anisopliae* chitinases and ENGases and a more detailed study concerning the enzymes' roles in morphological or nutritional functions will allow comprehensive insights into the chitinolytic potential of this highly infective entomopathogenic fungus. In order to proceed on the study of *M. anisopliae* chitinases, four vectors to sgC chitinases single gene knock-outs were developed by using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and a few mutant strains were recovered. Multiple phenotypic and genetic analyses will be performed to evaluate the modifications induced by sgC chitinase gene mutant strains after their validation.

1 Introdução

Os fungos filamentosos compreendem organismos eucarióticos, com grande plasticidade bioquímica, de distribuição cosmopolita e com capacidade secretora altamente desenvolvida [Conesa *et al.*, 2001; Bouws *et al.*, 2008]. A ampla aplicabilidade desses organismos na indústria, na medicina e na agricultura motivou o estudo dos fungos filamentosos como importantes modelos de pesquisa [Punt *et al.*, 2002; Ward, 2012; Nevalainen & Peterson, 2014]. Devido a facilidade de manuseio destes organismos algumas espécies foram modelos centrais nos primeiros estudos de Genética e Bioquímica e cada vez mais são utilizados como foco de estudos básicos. Esses organismos podem ser patógenos de artrópodes, de outros fungos, de plantas e de animais, incluindo humanos, o que explica a sua utilização como objeto de estudo das interações que ocorrem entre os patógenos e seus hospedeiros [Shah & Pell, 2003, Kubicek *et al.*, 2011; Bourgeois & Kuchler, 2012; Dean *et al.*, 2012]. Esses são alguns dos aspectos que contribuíram para a geração de um volume considerável de dados genômicos, de estudos funcionais em larga escala e de ferramentas moleculares para estudos de genômica funcional, todos englobando uma variedade de espécies fúngicas [Jiang *et al.*, 2013].

Distintas áreas da biologia de fungos filamentosos incluindo ecologia, evolução, genética, biologia molecular e bioquímica foram estudadas utilizando como modelo espécies do gênero *Metarhizium*. As espécies desse gênero são amplamente utilizadas para promover o biocontrole de diversas pragas da agricultura e da pecuária e de vetores de doenças como alternativa ao uso de pesticidas químicos [Faria & Wraight, 2007]. A capacidade de infectar eficientemente diferentes artrópodes, exibida por *Metarhizium* spp., conduziu a busca por fatores envolvidos na interação entre esse fungo seus hospedeiros, de maneira que vários genes exibiram comprovada correlação com a virulência.

O recente sequenciamento do genoma de três espécies, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium acridum*, e a disponibilização de suas sequências permitiu um avanço na compreensão de diversos aspectos da biologia do fungo [Gao *et al.* 2011, Staats *et al.*, 2014]. A análise comparativa entre fungos que apresentam genomas sequenciados pode ser realizada pela detecção da presença ou ausência de genes com função já determinada em outros modelos [Braun *et al.*, 2000; Soanes *et al.*, 2008]. A presença de determinados genes pode indicar estratégias de ação e mecanismos de

patogenia universais ou específicos, além de análises evolutivas entre os organismos [Hsiang & Baillie, 2006; Steinberg & Perez-Martin, 2008]. Desta maneira, a atribuição da função gênica, a qual exige esforço experimental, pode ser beneficiada pelas análises prévias *in silico*.

Além dos dados genômicos, a disponibilidade dos dados transcritômicos e proteômicos com consequentes comparações em grande escala podem indicar alvos para melhorar a eficácia: (i) do biocontrole fúngico e também, (ii) do desenvolvimento de novas metodologias de controle de patógenos humanos.

Uma característica comum de genomas dentre diferentes eucariotos é a presença de famílias multigênicas [Zhao *et al.*, 2013]. Dentre as famílias com número elevado de genes, estão representadas as glicosil hidrolases, enzimas que hidrolisam carboidratos. É de interesse do nosso grupo estudar a família das quitinases, uma dessas famílias multigênicas presentes em fungos filamentosos e que apresentam funções essenciais em diversos aspectos da biologia dos fungos. As quitinases degradam as fibras de quitina, as quais estão presentes na parede celular fúngica e também no exoesqueleto dos hospedeiros artrópodes e são fontes abundantes de nutrientes. A atribuição de funções para cada um dos genes de uma família multigênica é uma tarefa complexa entretanto, o estudo das quitinases poderá auxiliar na otimização de formulações contendo *Metarhizium* e na sua utilização como biocontrolador, não somente de pragas da agricultura e pecuária, mas também como controlador de vetores de doenças humanas.

1.1 *Metarhizium anisopliae* - características gerais, biocontrole e patogenicidade

A maior parte das espécies de *Metarhizium* estudadas e conhecidas são anamórficas (apresentam somente fase assexuada) e seu ciclo celular promove a sucessão de indivíduos clonais. Descritas em menor número, algumas espécies teleomórficas (apresentam fase sexuada) foram anteriormente descritas como pertencentes ao gênero *Metacordyceps* [Sung *et al.*, 2007] e atualmente, foi sugerido que sua nomenclatura retorne para *Metarhizium* [Kepler *et al.*, 2014]. Até então o número de espécies contidas no gênero *Metarhizium* era de onze [Bischoff *et al.*, 2009], considerando as seguintes: *M. anisopliae*, *Metarhizium guizhouense*, *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium brunneum*, *M. acridum*, *Metarhizium lepidiotae*, *Metarhizium majus*, *Metarhizium globosum*, *M.*

robertsii, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium frigidum*. Nesta última atualização de 2014, os autores decidiram utilizar a nova tendência de nomenclatura “one name for one fungus” [McNeil *et al.*, 2012], a qual unifica em um nome os diferentes estágios de desenvolvimento (anamorfo e teleomorfo) fúngico. A situação do gênero *Metarhizium* é complicada devido ao fato de que diversas espécies teleomorfas de outros gêneros, como *Pochonia*, *Nomuraea* e *Paecilomyces* pertenciam ao gênero *Metacordyceps*, e como o nome *Metarhizium* é o mais antigo, ele apresenta prioridade de utilização na classificação. Dessa forma, diversas espécies foram reclassificadas, de maneira que esse gênero agora apresenta em torno de 29 espécies.

1.1.1 *M. anisopliae* apresenta diferentes tipos celulares em seu ciclo de vida

M. anisopliae é descrito como causador da infecção fúngica chamada *green muscardine*, baseada na incrustação dos cadáveres de artrópodes com conídios verdes [Roberts & St. Leger, 2004]. Esse fungo apresenta a capacidade de se diferenciar em tipos celulares durante seu ciclo de vida, modificando-se a partir de conídios, em hifas, tubos germinativos, apressórios e blastosporos [Schrank & Vainstein, 2010] (Figura A). A primeira etapa da infecção é a adesão de esporos na superfície da carapaça de um hospedeiro suscetível onde ocorre o desenvolvimento de um tubo germinativo e, em sua extremidade apical, ocorre a formação do apressório. O apressório é uma estrutura especializada de penetração que se forma com a dilatação da extremidade da hifa e a formação de turgor. Essa estrutura de penetração utiliza força mecânica gerada a partir da pressão de turgor e também a secreção de enzimas hidrolíticas para permitir a dissolução da carapaça do hospedeiro. Após transpor a carapaça, o fungo se diferencia novamente ao atingir a hemolinfa do hospedeiro, desta vez em células unicelulares leveduriformes, os blastosporos ou corpos de hifas (*hyphal bodies*). Esses tipos celulares apresentam a capacidade de evadir sua detecção pelo sistema imune dos artrópodes e utilizam a principal fonte de carbono presente na hemolinfa, a trealose, para se disseminar. Após exaurir as fontes de carbono disponíveis, ocorre a extrusão do fungo na superfície do hospedeiro com a formação de novos esporos para a disseminação.

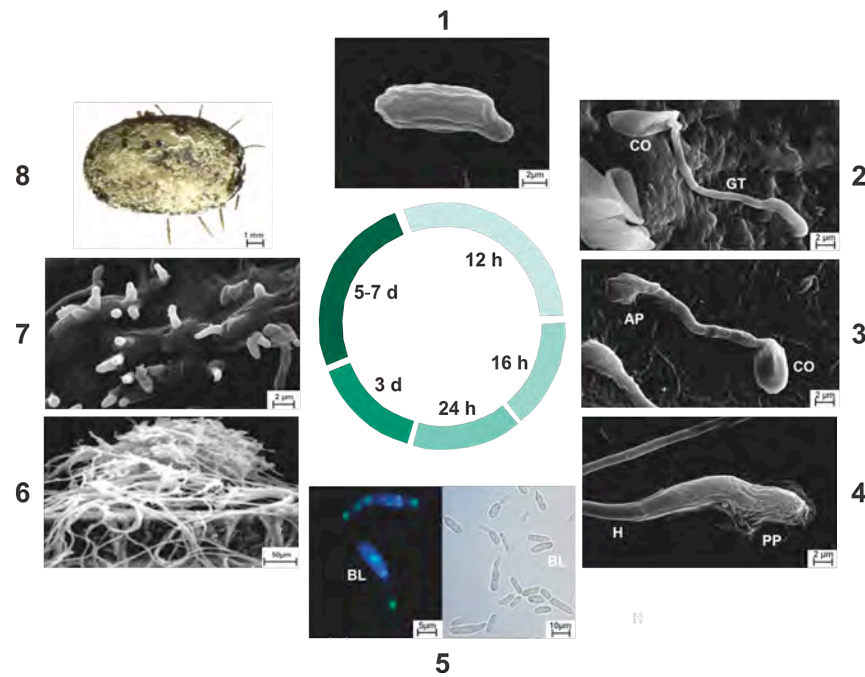


Figura A: Ciclo de infecção de *M. anisopliae* demonstrando os tipos celulares diferenciados conforme as etapas de infecção sobre o carrapato bovino *R. microplus*.

1 – adesão do esporo na superfície do carrapato, 2 – desenvolvimento do tubo germinativo, 3 – formação de um apressório na extremidade do tubo germinativo, 4 – grampo de penetração formado na extremidade da hifa envolvido por secreção mucilaginosa, 5- blastosporos, 6 – colonização extensiva pelo desenvolvimento de massa micelial, 7 – extrusão de hifas novas sob o carrapato, 8 – esporulação de *M. anisopliae* sob *R. microplus*. As etapas 1-8 estão relacionadas temporalmente compreendendo o período de infecção de 0 até 7 dias. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP – apressório, PP – grampo de penetração, H- hifa, BL – blastosporos (imagem modificada a partir de Schrank & Vainstein, 2010).

Em espécies teleomórficas do fungo há uma diferenciação celular em relação as espécies anamórficas, a qual promove a formação de um corpo de frutificação sobre os cadáveres dos artrópodes infectados, como pode ser observado para *Cordyceps militaris*, teleomorfo sugerido de *Metarhizium* (Figura B).



Figura B: Estrutura formada pela espécie teleomórfica *C. militaris* durante a infecção (região alaranjada). Pupa de *Chinese Tussah silkmoth* colonizada por *C. militaris* (imagem modificada a partir de Zheng *et al.*, 2011).

O modo nutricional ancestral para os fungos da ordem Hypocreales é inferido como tendo sido baseado em plantas, e posteriormente, evoluído por mudanças do hospedeiro vegetal para animais e outros fungos [Sung *et al.*, 2008]. Sung *et al.* [2008] afirmam que durante o período Cretáceo houve uma diversificação dos patógenos de animais (em especial artrópodes) em três famílias da ordem Hypocreales: Clavicipitacea, Cordycipitacea e Ophiocordycipitacea. Ainda, é sugerido que a atual distribuição filogenética fúngica da associação com hospedeiros é produto de múltiplas mudanças de hospedeiros intra- e inter-reinos (entre fungos, animais e plantas). Espécies de *Metacordyceps* (Clavicipitacea) são caracterizadas por mudanças intra-reino entre os grupos invertebrados Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera e Nematoda; e a ecologia deste clado é predominantemente de patógenos de artrópodes [Sung *et al.*, 2008].

Dentre inúmeros genomas de fungos filamentosos sequenciados (uma busca no banco de dados de genomas do NCBI por *Genome>Ascomycetes* retorna 292 genomas, e uma busca por *Genome>Filamentous fungi* retorna 39 genomas), a maior parte deles

abrange fungos fitopatogênicos, saprófitas ou patogênicos humanos. Os primeiros genomas sequenciados de fungos entomopatogênicos foram o de *M. robertsii* e o de *M. acridum*, e posteriormente, também foram sequenciados os genomas de *Cordyceps militaris*, de *Beauveria bassiana* [Gao *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012] e, mais recentemente, de *M. anisopliae* E6 pelo nosso grupo [Staats *et al.*, 2014]. A análise dos genomas indicou que espécies de *Metarhizium* são mais próximas filogeneticamente de fungos endófitos, como *Epichloë festucae*, e de fitopatógenos do que de patógenos de animais como *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* [Gao *et al.*, 2011].

Os genomas das duas espécies de *Metarhizium* descritos permitem uma comparação entre uma linhagem com amplo espectro de hospedeiros, *M. robertsii* e uma linhagem patogênica apenas para gafanhotos, *M. acridum*. A partir desses dados é possível explorar questões relacionadas a ecologia, evolução e preferência de hospedeiros entre as duas espécies. *M. robertsii* é capaz de colonizar a rizosfera e auxiliar no desenvolvimento de plantas [Behie *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013]. *M. robertsii* contém um número maior de famílias gênicas e essas famílias contém maior número de membros do que *M. acridum* [Gao *et al.*, 2011]. O número de enzimas envolvidas na degradação da cutícula dos insetos, como lipases, proteases e quitinases, também é maior em linhagens generalistas do que em linhagens especialistas [Xiao *et al.*, 2012].

1.1.2 *M. anisopliae* e o biocontrole

A preocupação com o impacto ambiental causado pelos pesticidas químicos estimulou a busca por alternativas ambientalmente corretas, destacando-se entre elas a utilização de agentes biocontroladores. O biocontrole é a utilização de um organismo predador sobre um organismo hospedeiro suscetível, e está baseado na relação ecológica existente entre espécies que são inimigos naturais [Engler & Rogoff, 1976]. Essa característica natural foi manipulada com o objetivo de controlar os efeitos causados por pragas há muito anos. Em 1879, Metschnikoff, na tentativa de diminuir a grande perda econômica causada pela infestação das plantações de cereais com o besouro *A. austriaca*, sugeriu a produção, dispersão e aplicação de conídios de *M. anisopliae* para promover o biocontrole [Lord, 2005].

Estima-se que existam entre 4 e 6 milhões de espécies artrópodes, o que caracteriza esse grupo como o mais abundante e diverso sobre a terra [Novotny *et al.*, 2002], não somente em número de espécies mas também em número de indivíduos. Os artrópodes são infectados por inúmeros patógenos como vírus e bactérias; entretanto, a maior proporção das infecções em insetos é ocasionada por fungos. Essa relação demonstra o impacto que os fungos causam na população de insetos e o potencial de utilização de biocontrole de insetos de interesse médico e agrônômico. Os fungos entomopatógenos são, portanto, fatores essenciais na regulação da população de pragas, tanto por apresentarem-se como alternativa única para o controle de insetos que sugam extratos vegetais e animais (seu aparato bucal não permite a passagem de bactérias), como para muitos coleópteros que não apresentam infecções causadas por bactérias ou vírus descritas. Outra vantagem é que os fungos infectam os insetos por penetração direta através da cutícula, ao contrário de bactérias e vírus que devem ser ingeridos para estabelecer a infecção [Roberts, 1989; Charnley, 1991; Hajek & St.Leger, 1994]

Dentre as mais de 700 espécies de entomopatógenos, as espécies dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* são àquelas mais frequentemente utilizadas no biocontrole. Algumas linhagens desses gêneros infectam quase todas as ordens de insetos e, por isso, grande atenção é despendida ao estudo desses gêneros. Mais de 75 % dos fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales estão associados com insetos nas ordens Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera, as quais coletivamente representam a maior diversidade de insetos fitófagos [Sung *et al.*, 2008]. Na Figura C pode ser observada a infecção característica de *M. anisopliae* sob alguns de seus hospedeiros suscetíveis, que incluem pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas [Lacey *et al.*, 1988; Kaaya & Munyinyi, 1995; Luz *et al.*, 1998; Scholte *et al.*, 2006].

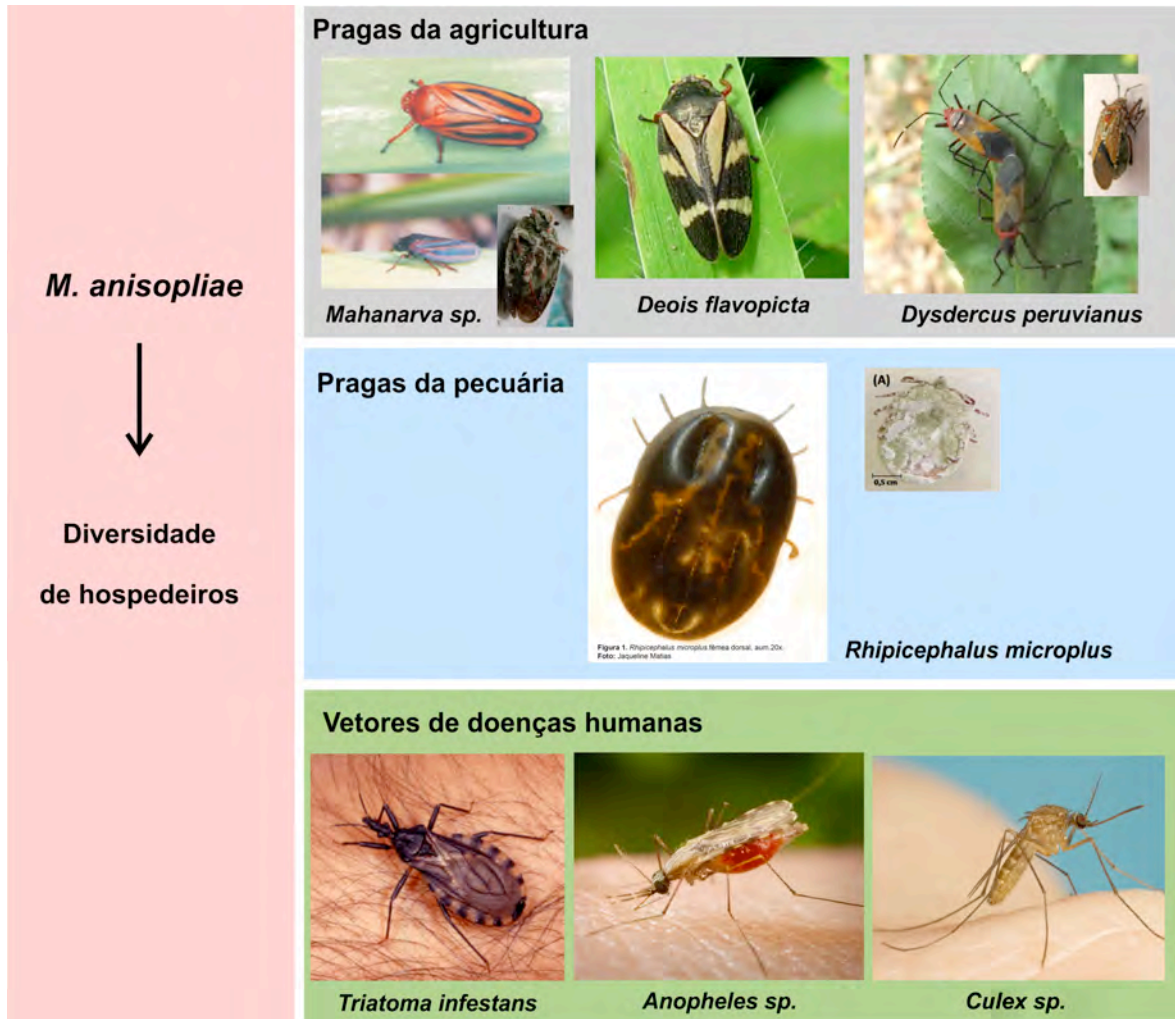


Figura C: O espectro de hospedeiros de *M. anisopliae* inclui pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas.

Exemplos de cada um dos grupos de hospedeiros são demonstrados. Nas imagens menores podem ser observados cadáveres de artrópodes cobertos por conídios verdes após infecção por *M. anisopliae*. (Imagens adquiridas a partir de: www.olicana.com.br, www.blogdocontrolebiologico.com, www.fmcagricola.com.br, www.embrapa.com.br, www.saude.gov.br, www.cameronwebb.wordpress.com)

1.1.3 Entomopatogenicidade

A entomopatogenicidade de *M. anisopliae* está correlacionada com a sua capacidade de secretar diversas enzimas, toxinas e metabólitos secundários [Schrank & Vainstein *et al.*, 2010]. Esses produtos de secreção apresentam atividade contra insetos, fungos, bactérias, vírus e células cancerosas [Isaka *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010]. A construção de mutantes nulos para genes específicos possibilitou a descoberta de vários determinantes de patogenicidade em *Metarhizium*. Algumas das proteínas, as quais tiveram seus genes deletados e para as quais houve um conseqüente decréscimo na virulência são: adesina (Mad1), proteína quinase (MaPKA1), fosfocetolase (Mpk1), proteína osmosensora (Mos1), protease (Pr1A), proteína tipo-colágeno (Mcl1), regulador da via de sinalização de proteína G (Cag8), perilipina (Mpl1) e quitinases (Chi2 e Chi3) [Wang & St.Leger, 2006; Fang *et al.*, 2007; Wang & St.Leger, 2007a, Wang & St.Leger, 2007b; Wang *et al.*, 2008; Boldo *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2013]. Evidenciou-se que essas proteínas apresentaram funções importantes em pelo menos uma das etapas de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros.

A interação patógeno-hospedeiro possibilitou também o estudo de características do próprio hospedeiros como, por exemplo, a determinação de proteínas do sistema imune de invertebrados diferencialmente expressas em hemócitos durante exposição a destruxina A do fungo [Fan *et al.*, 2014].

Nosso grupo tem se dedicado ao estudo celular e molecular de *M. anisopliae* durante o processo de infecção em seus hospedeiros e nos aspectos que envolvem a interação desse fungo com seus hospedeiros. Uma das famílias de proteínas que está diretamente envolvida na patogenicidade de *M. anisopliae* são as quitinases. Estas enzimas são responsáveis pela dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros, além de apresentarem função estrutural, morfológica, autolítica e nutricional em fungos [Adams, 2004]. Pela construção de mutantes deletados para o gene *chi2*, demonstramos a importância dessa quitinase no processo de infecção de *M. anisopliae*, devido a diminuição ocasionada na virulência contra o hospedeiro *Dysdercus peruvianus*, e linhagens que superexpressaram essa quitinase foram mais virulentas [Boldo *et al.*, 2009]. Ainda, a superexpressão do gene *chi3*, que codifica a quitinase CHIT30 [Pinto *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2005] também resultou no aumento da virulência contra *D. peruvianus* [Staats *et al.*, 2013].

1.2 Quitina - na parede celular fúngica e no exoesqueleto de artrópodes

A presença de quitina na parede celular é uma característica exclusiva apresentada por fungos e está ausente na parede celular de plantas e bactérias. A quitina é um componente essencial da parede celular de fungos e está presente também no exoesqueleto de artrópodes (Figura D). Essas estruturas conferem proteção e resistência aos sistemas biológicos nos quais estão presentes. A quitina, $(C_8H_{13}O_5N)_n$, é um homopolímero linear composto de unidades de N-acetilglicosamina, ligadas por ligações β -1-4, arranjada em microfibrilas de configuração antiparalela (α), paralela (β) ou mista (γ) [Dahiya *et al.*, 2006]. As N-acetilglicosaminas (GlcNAc) são monossacarídeos derivados da glicose que contém um grupo acetamido ligado ao carbono 2.

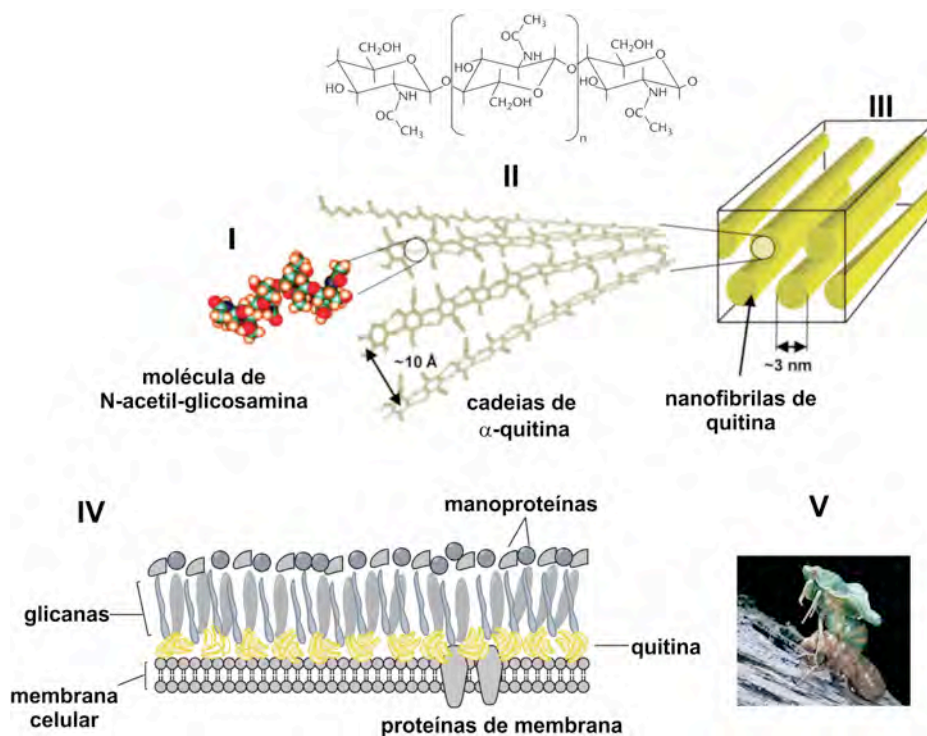


Figura D: Estrutura da quitina e sua presença nas paredes celulares de fungos e no exoesqueleto de artrópodes.

I - moléculas de N-acetilglicosamina (GlcNAc), II – estrutura química da quitina (acima) e cadeias de α -quitina (abaixo), III – nanofibrilas de quitina (Imagem modificada de Nikolov *et al.*, 2011 e de Martínez *et al.*, 2009), IV – Quitina como um dos componentes da parede celular fúngica (Imagem modificada de Vega & Kalkum, 2012), V – Artrópode liberando sua exúvia (exoesqueleto velho), composta em grande parte por quitina (Imagem modificada de oriabure-biology.wikispaces.com).

A diferenciação de tipos celulares apresentada pelos fungos durante o seu ciclo de vida requer a atuação combinada de enzimas que promovam o remodelamento adequado da parede celular para permitir as mudanças entre os tipos celulares. Tanto o local da germinação do esporo quanto os sítios de uma nova ramificação nas paredes rígidas das hifas precisam ser “fragilizados” para permitir a formação de um novo ápice, e as enzimas líticas são componentes óbvios neste processo. As paredes cilíndricas das hifas, ao contrário do seu ápice, são estruturas rígidas. As microfibrilas de quitina são maiores, mais cristalinas e apresentam ligações cruzadas (covalentes e não-covalentes) com outros componentes da parede celular (β -glicanas). A parede apical é plástica, formada por polímeros que ainda não apresentam ligações cruzadas entre si, e que se torna progressivamente rígida pelas ligações entre seus polímeros [Wessels, 1993]. A formação de ramificações está associada com o acúmulo localizado de hidrolases, como as quitinases, glicanases e transglicosilases.

1.3 Quitinases

Polímeros como a quitina são substratos para a ação de glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-). Glicosil hidrolases são enzimas que clivam, modificam ou criam ligações glicosídicas entre carboidratos. O banco de dados CAZY (*Carbohydrate-Active enZYmes Database*, www.cazy.org) [Cantarel, 2009; Lombard *et al.*, 2014] especializado em enzimas que atuam sobre carboidratos, classifica atualmente 133 diferentes famílias de glicosil hidrolases, as quais são categorizadas conforme a similaridade de suas sequências de aminoácidos. Essa classificação reflete preferencialmente as características estruturais destas enzimas ao contrário de somente sua especificidade ao substrato e, portanto, auxilia na descoberta de relações evolutivas entre as enzimas e fornece base para compreender o mecanismos de ação enzimáticos [Cantarel, 2009].

As quitinases são classificadas em duas famílias de glicosil hidrolases, famílias GH18 e GH19, e essa diferenciação se baseia na similaridade das sequências de aminoácidos, na presença de motivos conservados e na estrutura das proteínas [Henrissat, 1991]. Não há conservação de sequências de aminoácidos entre membros da família GH18 e da família GH19. Além disso, as proteínas dessas duas famílias distintas apresentam diferentes estruturas tridimensionais: a família 18 tem um domínio catalítico em forma de

barril (α/β)₈, enquanto a família 19 é predominantemente composta de α -hélices e apresenta uma estrutura bilobada. O mecanismo enzimático é diferente entre as quitinases das duas famílias: as quitinases GH18 têm um mecanismo de retenção, o qual resulta em quito-oligossacarídeos com configuração β -anomérica, enquanto as quitinases GH19 têm um mecanismo de inversão e seus produtos são α -anômeros [Davies & Henrissat, 1995]. Além disso, apenas as quitinases GH18 são inibidas por alosamidina [Sakuda *et al.*, 1986].

A distribuição das quitinases GH18 é ubíqua, estando presentes em vírus, bactérias, plantas, fungos, animais e humanos [Perrakis *et al.*, 1994; Hawtin *et al.*, 1995; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 2000]. Em sua maioria, as quitinases GH19 são encontradas em plantas [Truong *et al.*, 2003], mas também há estudos de quitinases GH19 presentes em bactérias, vírus e nematóides [Ohno *et al.*, 1996; Geng *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2003; Honda *et al.*, 2008,].

Dentre as enzimas categorizadas na família 18 das glicosil hidrolases (GH18) estão as quitinases (E.C.3.2.1.14), as ENGases (E.C.3.2.1.96), as lisoenzimas (E.C.3.2.1.17) e as quitolectinas (E.C. 3.2.1,-). Essas enzimas hidrolisam ligações β -(1 \rightarrow 4) entre resíduos de *N*-acetil- β -D-glicosamina (GlcNAc) ou entre GlcNAc e outros resíduos. As quitinases hidrolisam as ligações β -(1 \rightarrow 4) entre resíduos de *N*-acetil- β -D-glicosamina das fibras de quitina liberando dímeros (quitobiose) ou monômeros de GlcNAc. As ENGases (endo- β -*N*-acetilglicosaminidases) hidrolisam a ligação glicosídica entre resíduos de GlcNAc que estão presentes em proteínas glicosiladas, atuando portanto, principalmente na deglicosilação de proteínas. As lisoenzimas hidrolisam as ligações β -(1 \rightarrow 4) entre resíduos de GlcNAc e de ácido *N*-acetilmurâmico em peptídeoglicanas e entre resíduos de GlcNAc contidos em quitodextrinas. Já as quitolectinas perderam a capacidade de realizar hidrólise, no entanto ainda são capazes de se ligar a fibra de quitina [Lombard *et al.*, 2014].

As quitinases de fungos descritas até então pertencem a família 18 das glicosil hidrolases. As quitinases são produzidas em todos os estágios de crescimento ativo dos fungos; durante a germinação dos esporos, no crescimento exponencial e no desenvolvimento do micélio [Gooday, 1992]. As microfibrilas de quitina são hidrolisadas em suas ligações β -1,4 pela ação das quitinases e a hidrólise completa da quitina é realizada pela ação consecutiva de quitinases e *N*-acetilglicosaminidases (pertencentes a família GH20) até a obtenção de monômeros de *N*-acetilglicosamina.

Além das modificações celulares e do remodelamento da parede celular, as funções potenciais para as quitinases também incluem a degradação de quitina exógena para obtenção de uma fonte de nutrientes, como defesa e competição contra outros fungos e para romper o exoesqueleto de seus hospedeiros artrópodes [Seidl, 2008; Hartl *et al.*, 2012].

De acordo com Funkhouser & Aronson [2007] as quitinases são uma família gênica antiga altamente expressa em Archaea, Bacteria e Eukarya. A grande variação no número de genes de quitinases contidos em genomas fúngicos pode ser observado pela diferença de um gene em *Schizosaccharomyces pombe* até 36 genes em *Trichoderma virens* [Gruber & Seidl-Seiboth, 2012]. As diferentes espécies do gênero *Metarhizium* que foram sequenciadas, *M. robertsii*, *M. acridum* e *C. militaris*, exibem alto conteúdo de genes de quitinases [Gao *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2011]. As relações filogenéticas entre as quitinases e a composição de domínios encontrados nessas enzimas foram utilizados para classificá-las em subgrupos.

1.3.1 Classificação das quitinases em subgrupos

Dezoito sequências que codificam quitinases foram encontradas em uma análise do genoma de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) e a classificação dessas proteínas da família GH18 foi pioneira na área de fungos, de modo que, a proposição foi utilizada para classificar a proteínas GH18 em outros fungos. Essa análise envolve a composição de domínios das proteínas GH18 e suas relações filogenéticas, acomodando-as em três diferentes subgrupos A, B e C [Seidl *et al.*, 2005; Seidl, 2008].

As quitinases dos subgrupos A e C apresentam o sítio de ligação ao substrato em formato de túnel, com profundidade, formando uma estrutura tridimensional que sugere atividade de exoquitinase, a qual libera dímeros de GlcNAc ou quito-oligômeros a partir das extremidades da quitina. As quitinases do subgrupo B apresentam um sítio de ligação ao substrato mais aberto e pouco profundo, normalmente encontrado em endoquitinases [Eijsink *et al.*, 2008]. As endoquitinases efetuam a hidrólise em ponto internos da cadeia de quitina, liberando quito-oligosacarídeos de tamanhos diversos. Ambos os mecanismos de ação, endo- e exo-, podem ocorrer juntamente com a processividade. Enzimas que apresentam processividade não liberam o substrato após uma clivagem, mas permanecem

ligadas, de maneira que o substrato pode se deslocar e outro sítio pode ser clivado [Eijsink *et al.*, 2010].

Diferentes domínios são encontrados nas quitinases GH18. Enquanto algumas quitinases apresentam um único domínio, o domínio GH18, outras apresentam uma composição de diferentes domínios. O domínio GH18 contém as regiões conservadas DxxDxDxE e S/AxGG, as quais correspondem ao sítio catalítico e a região de ligação ao substrato, respectivamente. São detectados nessas enzimas também diferentes módulos de ligação a carboidratos (CBM – *Carbohydrate-Binding Modules*). Em fungos, os CBMs usualmente detectados são: (i) CBM18, que apresenta capacidade de ligação a quitina (anteriormente denominado domínio de ligação a quitina - ChBD), (ii) CBM1, que se liga a celulose e a quitina (anteriormente denominado CBD) e (iii) CBM50, o qual pode ligar-se a peptidoglicanas e a quitina (também denominado domínio LysM). Regiões ricas em serinas e treoninas também são detectadas em quitinases GH18 [Seidl, 2008]. As quitinases dos três subgrupos apresentam diferentes estruturas modulares, de maneira que: (i) no sgA não há CBM18 nem CBM1; (ii) no sgB há CBM1 na região C-terminal das quitinases, (iii) e no sgC há CBM18 e CBM 50, ambos na região N-terminal das quitinases [Seidl, 2008], como pode ser observado na Figura E.

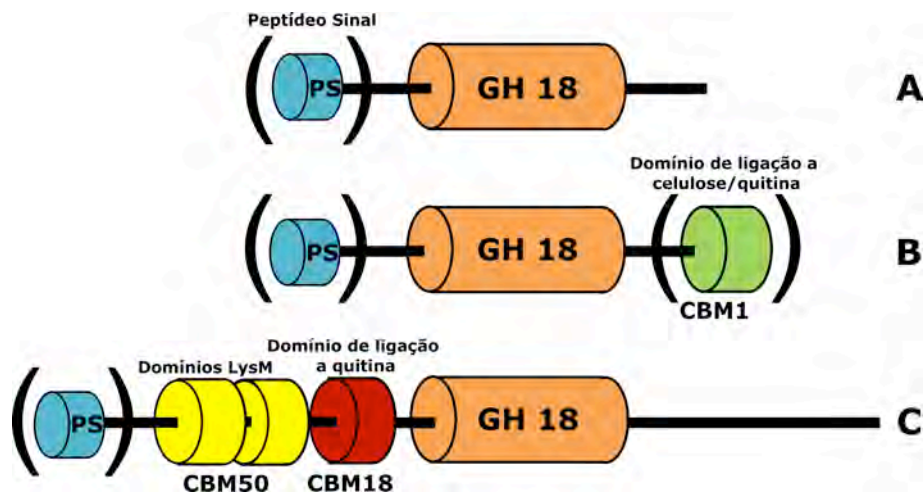


Figura E: Presença de diferentes módulos caracterizam os subgrupos de quitinases. Subgrupos sugeridos por Seidl *et al.*, [2005] (A, B e C) estão colocados ao lado da representação esquemática dos domínios presentes em proteínas da família 18 das glicosil hidrolases. GH18 – domínio catalítico das glicosil hidrolases da família 18, PS – peptídeo sinal, CBM1 – domínio de ligação a celulose/quitina, CBM18 – domínio de ligação a quitina, CBM50 – domínios de ligação a peptidoglicanas/quitina ou domínios LysM. Os parênteses indicam que a presença de determinado domínio não é obrigatória.

As quitinases de origem vegetal se enquadram em cinco classes, nomeadas de I até V, sendo que algumas quitinases fúngicas são similares as quitinases de origem vegetal da classe III [Duo-Chuan, 2006].

Assim como há uma grande variação do número de quitinases que estão presentes nos diferentes fungos, o número de quitinases de cada subgrupo que compõem a família GH18 em um mesmo micro-organismo também varia consideravelmente. Contudo, de maneira geral, as quitinases dos subgrupos A estão em maior número, seguido pelas quitinases do sgB. No entanto, algumas espécies de *Trichoderma*, por exemplo, apresentam um maior número de quitinases do sgC [Karlsson & Stenlid, 2008; Seidl, 2008].

1.3.1.1 Subgrupo A

As quitinases do sgA apresentam massa molecular média entre 40-50 kDa e estão presentes em todos os fungos. De maneira geral, os grupos dos ascomicetos têm aproximadamente seis quitinases do sgA e os basidiomicetos aproximadamente quatro, mas esses números variam bastante, de forma que *Ustilago maydis* possui duas quitinases desse sg e *Fusarium oxysporum* apresenta 12 quitinases do sgA [Seidl, 2008]. *M. robertsii* possui oito quitinases no sgA, *M. acridum* possui sete e *C. militaris* possui cinco [Gao *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2011]. A quitinase mais conservada no reino dos fungos e a mais abundantemente expressa se encontra nesse subgrupo, e é classificada como Chi18-5 em *T. reesei* [Seidl, 2008]. Em *M. anisopliae*, apenas uma endoquitinase desse subgrupo, CHIT1, foi isolada e caracterizada [Bogo *et al.*, 1998; Baratto *et al.*, 2003].

Uma das funções sugeridas para as quitinases do sgA é a participação dessas enzimas na fase autolítica do ciclo de vida fúngico (Tabela A). A autólise pode ser descrita como um processo natural de auto-degradação das células [Shin *et al.*, 2009]. Este processo é observado em fungos filamentosos em estágios avançados de cultivo, quando pode ser observado um aumento substancial na atividade de enzimas líticas, principalmente de carbohidrolases.

A quitinase ChiB de *Aspergillus nidulans* está envolvida na autólise deste fungo. Uma menor eficiência na lise das hifas em estágios avançados de cultivo foi observada após a deleção do gene *chiB* e a proteína ChiB foi altamente induzida em condição de

privação de fontes de carbono [Yamazaki *et al.*, 2007]. Em mutantes $\Delta flbA$ (caracterizados por intensa autólise) a deleção do gene *chiB* (gerando o mutante duplo $\Delta flbA\Delta chiB$) resultou em ausência de sinais de autólise por até 8h em cultivo submerso de *A. nidulans*. Em cultivos de meio sólido em placas com exposição ao ar, o mutante duplo apresentou autólise apenas parcial, ao contrário da intensa autólise observada no mutante único para *flbA* [Shin *et al.*, 2009]. Mais de 90 % da atividade quitinolítica extracelular medida em cultivos autolisados de *A. nidulans* é atribuída a proteína ChiB [Pusztahelyi *et al.*, 2006].

Outra função sugerida para as quitinases do sgA é a participação na interação entre fungos micopatógenos e seus alvos (Tabela A), como pôde ser observado para o gene *chi46* de *Chaetomium globosum*. Esse gene foi induzido contra fragmentos da parede celular em ensaios de confronto contra oomycetos e apresentou um aumento de 306,5 vezes no nível de transcritos expressos após tratamento com partes da parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* [Liu *et al.*, 2008]. Em outro micopatógeno, *Trichoderma harzianum*, também foi observada a expressão fortemente aumentada do gene *ech42* durante interação com fungo fitopatogênico *in vitro* [Carsolio *et al.*, 1994]. Da mesma forma, o gene da endoquitinase *sechi44* do micoparasita *Stachybotrys elegans* apresentou seu nível de transcritos aumentado em torno de 500 vezes após 48 h de interação com fragmentos da parede celular do fungo *Rhizoctonia solani* [Morissette *et al.*, 2006]. Em *Neurospora crassa*, dois genes do sgA (*gh18-3* e *gh18-4*) foram induzidos durante interação deste fungo com *Fusarium sporotrichoides* quando comparado com sua expressão em meio mínimo [Tzelepis *et al.*, 2012].

1.3.1.2 Subgrupo B

As quitinases do sgB apresentam massa molecular bastante variável, de 30-90 kDa, e podem ser observados dois grupos, o primeiro compreende quitinases que possuem entre 30-45 kDa e que apresentam domínios CBM e o segundo grupo compreende quitinases maiores, de até 90 kDa, as quais apresentam regiões ricas em serinas e treoninas e sítios de ancoramento a GPI [Seidl, 2008]. O número de quitinases do sgB presentes em fungos também varia muito. Algumas espécies como *Aspergillus niger*, *A. nidullans*, *N. crassa* e *Magnaporthe grisea* apresentam entre dois e três genes e espécies de *Fusarium* apresentam até mesmo uma quitinase do sgB. Já *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *A. fumigatus*,

Aspergillus clavatus e *R. oryzae* apresentam mais de cinco quitinases do sgB [Seidl, 2008] *M. robertsii* possui sete quitinases nesse sg, *M. acridum* possui seis e *C. militaris* possui quatro [Gao *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2011].

Em leveduras, algumas quitinases do subgrupo B (sgB) demonstraram participação na morfogênese, pois mutantes para tais genes apresentaram estruturas anormais. A quitinase CTS1 de *Saccharomyces cerevisiae*, CHT2 e CHT3 de *C. albicans* e KlCtsp1 de *Kluyveromyces lactis* apresentam função na separação celular entre as células mãe e filha após a divisão e na esporulação [Kuranda & Robbins, 1991; McCreath *et al.*, 1996; Colussi *et al.*, 2005; Dunkler *et al.*, 2005].

Em fungos filamentosos também foram detectadas evidências que apontam para a participação de quitinases do sgB na morfogênese (Tabela A). A quitinase ChiA de *A. nidulans* é uma proteína ancorada a GPI, glicosilada e está localizada nos sítios de germinação do conídio, nas regiões de ramificações das hifas, nos septos e também no ápice das hifas. Desta maneira, esta proteína pode ser responsável pelo remodelamento da parede celular quitinosa rígida para uma estrutura mais frouxa nos sítios de germinação do conídio e nas regiões de ramificação das hifas [Yamazaki *et al.*, 2008].

Para verificar a participação das quitinases do sgB de *A. fumigatus* na morfogênese, Alcazar-Fuoli *et al.* [2011] construíram um mutante quártuplo para os genes do sgB; no entanto, não foram observados defeitos na germinação ou no desenvolvimento fúngico, apesar de uma redução na atividade quitinolítica total ter sido detectada. Em *A. fumigatus*, portanto, as quitinases do sgB não apresentam um papel essencial na morfogênese. Contudo, uma pequena diminuição no desenvolvimento do fungo durante a autólise foi observada nesse mutante quártuplo sugerindo que as quitinases desse subgrupo apresentam uma função nutricional durante a fase autolítica em *A. fumigatus*, talvez fornecendo energia ao fungo pela degradação de células *ghosts* e retardando a morte celular. A deleção sucessiva das cinco quitinases resultou em um decréscimo da atividade quitinolítica total e específica, mas esse decréscimo não ultrapassou 20 % da atividade total e 30 % da atividade específica.

Além disso, é sugerido que quitinases do sgB em fungos micopatógenos possam estar envolvidas na degradação da parede celular de outros fungos. A expressão do gene *ech30*, de *T. atroviride*, foi induzida pela presença de *B. cinerea* em ensaios de confronto em placas [Klemsdal *et al.*, 2006]. Transcritos do gene *chi18-13* de *T. atroviride* foram

altamente expressos em ensaios de confronto com o fitopatógeno *R. solani* e quando cultivados com fragmentos da parede celular deste fungo [Seidl *et al.*, 2005].

Em *M. anisopliae*, foram construídos mutantes nulos para os genes *chi2* e *chi3* e, em ambas as linhagens deletadas, houve uma diminuição na virulência frente ao hospedeiro *D. peruvianus*, quando comparadas com a linhagem selvagem [Boldo *et al.*, 2010; Staats *et al.*, 2013]. Esses dados indicam uma participação dos genes do sgB de *M. anisopliae* na virulência contra hospedeiros.

1.3.1.3 Subgrupo B5

O subgrupo B apresenta uma divisão que reflete a separação filogenética das proteínas desse subgrupo em cinco ramificações principais, chamadas B-I, B-II, B-III, B-V. Além das quitinases, é sugerido que no sgB5 (ou B-V) encontram-se genes contendo o domínio GH18 e que codificam para ENGases (endo- β -N-acetilglicosaminidases). É proposto que essas enzimas atuem sobre proteínas glicosiladas participando da hidrólise de oligossacarídeos de GlcNAc e, portanto, deglicosilando as proteínas [Stals *et al.*, 2010]. Em *T. reesei*, *T. virens* e *T. atroviride* foram detectados duas proteínas neste subgrupo; e em *M. robertsii* existem três proteínas sgB5, em *M. acridum* e *C. militaris* existem duas [Gao *et al.*, 2011, Zheng *et al.*, 2011].

Em animais e plantas, as ENGases intracelulares pertencem a família GH85 das glicosil hidrolases e atuam na via de degradação de glicoproteínas ERAD [Suzuki & Funakoshi, 2006]. Proteínas mal dobradas são identificadas dentro do retículo endoplasmático e são degradadas pela via ERAD (*Endoplasmatic Reticulum Associated Degradation*). Antes da proteólise, as cadeias de carboidratos de N-glicanas são removidas por PNGases (peptide:N-glicanases) para gerar oligossacarídeos livres, seguido de uma clivagem posterior do grupamento N-acetilquitobiose por ENGases, o que resulta em oligossacarídeos livres liberados com uma GlcNAc na sua extremidade. Entretanto, em fungos a situação é mais complexa. Não foram detectadas proteínas da família GH85 em vários ascomicetos. Além disso, em alguns fungos, como em *N. crassa*, não há PNGases e em *S. cerevisiae*, há PNGases mas não há ENGases [Chantret *et al.*, 2003]. Neste contexto, Tzelepis *et al.* [2012] sugerem que as ENGases da família GH18 podem estar envolvidas no processamento de glicoproteínas relacionado a via ERAD em ascomicetos filamentosos, substituindo a função das ENGases GH85 ausentes.

Alguns desses genes que codificam ENgases já foram estudados em fungos. Duas ENGases putativas, Eng18A (Chi18-rel1) e Eng18B (Chi18-rel2) foram detectadas em *T. reesei* posteriormente a classificação em subgrupos [Seidl *et al.*, 2005], devido a sua menor similaridade com as outras sequências de quitinases. Stals *et al.* [2010] demonstrou que Eng18A (EndoT ou chi18-rel1) está envolvida na deglicosilação de glicoproteínas com alto conteúdo de manose e não na degradação de quitina.

Em *N. crassa*, um mutante nulo para um gene que codifica uma ENGase, *gh18-10*, apesar de não apresentar diferenças morfológicas, demonstrou uma maior produção de hifas aéreas, maior conidiação e maior resistência ao estresse abiótico quando comparado com a linhagem selvagem, e também uma menor taxa de crescimento em meio mínimo ou contendo quitina [Tzelepis *et al.*, 2012]. A deleção do ortólogo *Eng18B* em *T. atroviride* mostrou fenótipos muito similares [Dubey *et al.* 2012]. Os fenótipos observados podem estar ligados a deleção da atividade de ENGase, a qual interfere na maturação e secreção de glicoproteínas. As linhagens $\Delta gh18-10$ secretam quantidades significativamente menores de proteínas extracelulares do que a linhagem selvagem. Além disso, a atividade de protease extracelular, à qual é atribuída em 80 % a uma protease alcalina glicosilada [Abbott & Marzluf, 1984], é também reduzida na linhagem $\Delta gh18-10$ [Tzelepis, *et al.*, 2012].

1.3.1.4 Subgrupo C

As quitinases desse subgrupo estão presentes unicamente em fungos. O número de quitinases desse sg é também bastante variável entre diferentes fungos, por exemplo, alguns ascomicetos apresentam um número maior de membros como *F. graminearum* (sete quitinases) *A. nidulans* (nove), *Nectria haematococca* (10) e *T. virens* (15) enquanto outros apresentam um número reduzido como *N. crassa* (três) e *M. grisea* (dois). As quitinases desse sg não parecem estar presentes em basidiomicetos [Seidl, 2008]. *M. robertsii* possui oito quitinases nesse sg, *M. acridum* possui três e *C. militaris* possui cinco [Gao *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011].

Quitinases do subgrupo C apresentam características exclusivas em relação a quitinases dos outros subgrupos. Elas são consideravelmente maiores que as outras (>100 kDa) e apresentam múltiplos domínios de ligação a carboidratos (CBMs). Em relação a posição do domínio GH18 nas quitinases desse subgrupo, é possível perceber que essas

apresentam dois tipos de arquitetura; no primeiro tipo, o domínio GH18 é localizado no centro da sequência de aminoácidos e, no segundo tipo, o domínio GH18 é localizado mais próximo da região N-terminal da proteína. Entre os CBMs frequentemente detectados nesse subgrupo estão: CBM18 e CBM50. O CBM18 é um domínio de ligação a quitina, com aproximadamente 40 resíduos, que apresenta cisteínas conservadas. Esses módulos são encontrados em quitinases juntamente com domínios GH18 ou em proteínas não-catalíticas, de maneira isolada ou em repetições [Boraston *et al.*, 2004]. O domínio CBM50 reconhece polissacarídeos contendo resíduos de GlcNAc, incluindo quitina e peptidoglicanas, e é também conhecido como LysM.

As espécies do gênero *Trichoderma* apresentam vários membros do sgC em seus genomas e estão entre as quitinases do sgC melhor estudadas. O padrão de expressão dos genes deste subgrupo foram analisados sob diferentes condições e os resultados indicaram que os genes do sgC não aparentam ser co-regulados e, portanto, podem não apresentar uma função comum, mas sim funções diversas durante o ciclo de vida deste organismo. As quitinases do sgC foram analisadas em *T. reesei*, *T. atroviride* e *T. virens* e comparadas entre si. *T. reesei* apresenta somente 4 genes que codificam para quitinases do sgC e há uma expansão considerável no número de quitinases em *T. atroviride* (nove genes) e *T. virens* (15 genes). Analisando oito genes do sgC em *T. atroviride* (genes *tac1* até *tac8*) Gruber *et al.* [2011a] detectaram uma indução de todos esses genes durante o micoparasitismo contra *Beauveria bassiana*. Além disso, foi sugerido que os genes *tac2* e *tac6* também podem estar envolvidos na formação de redes de hifas (*hyphal network formation*). Já em *T. virens*, os 15 genes de quitinases do sgC (*tvcl* até *tvcl5*) são regulados diferencialmente em duas distintas regiões da colônia fúngica (região central *versus* região periférica) e expressos durante interações intra e interespecíficas [Gruber *et al.*, 2011b]. Em *Trichoderma* sp., ensaios de confronto em placas são comumente utilizados para avaliar a capacidade de inibição do desenvolvimento de colônias fúngicas quando inoculadas em lados opostos e equidistantes em placa. As interações interespecíficas avaliam essa capacidade entre espécies distintas e antagonistas e as interações intraespecíficas (*self-interaction*) avaliam interações entre a mesma espécie.

Em *N. crassa* três genes do sgC foram estudados [Tzelepis *et al.*, 2012] e sugere-se que estejam envolvidos em diferentes funções biológicas devido a suas respostas diversas. O gene *gh18-6* foi induzido durante interações interespecíficas com *B. cinerea* e

F. sporotrichoides sugerindo uma função na degradação da parede celular destes fungos antagonistas. O gene *gh18-8*, apesar de também apresentar indução interespecífica, foi induzido mais fortemente em interação intraespecífica (*self-interaction*) sugerindo um papel na hidrólise da parede celular endógena. Além disso, a deleção de *gh18-6* não influenciou na expressão de *gh18-8*, fato que pode indicar que esses dois genes apresentam sinais reguladores diferentes e atuam provavelmente em diferentes funções. O gene *gh18-9* foi induzido em condição de estarvação e quando quitina foi utilizada como única fonte de carbono, e portanto, foi sugerido que este gene esteja envolvido na hidrólise de quitina para aquisição de nutrientes.

As quitinases do sgC demonstram expansão no número de representantes também em *Emmericela nidulans*, *Uncinocarpus reesii* e *Gibberella zeae* [Seidl, 2008]. Genes deste subgrupo apresentam similaridade com a subunidade alfa das toxinas *killer* da levedura *Kluyveromyces lactis*. Esta toxina (zimocina) apresenta três subunidades; α , β e γ , dentre as quais a toxicidade é atribuída somente a subunidade γ e as funções das subunidades α e β são permitir a entrada de γ para dentro da célula por permeabilização da parede celular e da membrana da levedura. [Stark 1990; Magliani, 1997]. Como no micopatógeno *H. atroviridis* o gene *chi18-10* (C-II) foi expresso durante seu desenvolvimento sobre a parede celular de outros fungos, mas não durante seu desenvolvimento na presença de quitina, foi sugerido que as quitinases do sgC neste fungo atuam durante as interações interespecíficas, provavelmente pela permeabilização da parede celular e membrana para permitir a penetração de moléculas antifúngicas no antagonista [Seidl *et al.*, 2005].

Karlsson & Stenlid também sugerem que as quitinases do sgC sejam dispensáveis para fungos patogênicos humanos pois há uma contração deste subgrupo (C-II) em *Coccidioides immitis* e *Ajellomyces capsulatus*; e o fungo *U. reesei* que é relacionado a *C. immitis* mas apresenta vida no solo além de ser patógeno humano, apresenta uma expansão do subgrupo C-II. Essas distintas trajetórias evolutivas podem refletir a adaptação a tipos de vida diferentes, com *C. immitis* minimizando interações antagonistas com outros fungos no solo e reduzindo membros do sgC e *U. reesei* mantendo quitinases deste subgrupo e permanecendo coma capacidade de viver em solo em contato com outros fungos.

Tabela A: Alguns exemplos de genes/proteínas da família GH18 estudados em diferentes fungos e suas funções preditas.

Sg	Gene*/ Proteína**	Organismo	Função sugerida
A	<i>chiB</i> *	<i>Aspergillus nidulans</i>	*menor eficiência na lise das hifas em estágios avançados de cultivo (autólise);
	ChiB**		** altamente induzida em condição de privação de fontes de carbono (autólise) [Yamazaki <i>et al.</i> , 2006].
	<i>chi46</i> *	<i>Chaetomium globosum</i>	* induzido em resposta a fragmentos da parede celular de oomycetos e aumento de 306,5 vezes no nível de transcritos expressos após tratamento com parede celular de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> [Liu <i>et al.</i> , 2008].
	<i>ech42</i> *	<i>Trichoderma harzianum</i>	* expressão fortemente aumentada durante interação com fungo fitopatogênico <i>in vitro</i> [Carsolio <i>et al.</i> , 1994].
	<i>sechi44</i> *	<i>Stachybotrys elegans</i>	* apresentou seu nível de transcritos aumentado em torno de 500 vezes após 48 h de interação com fragmentos da parede celular de <i>R. solani</i> [Morissette <i>et al.</i> , 2006].
	<i>gh18-3</i> * e <i>gh18-4</i> *	<i>Neurospora crassa</i>	* induzidos durante interação com <i>F. sporotrichoides</i> quando comparado com sua expressão em meio mínimo [Tzelepis <i>et al.</i> , 2012].
B	<i>chi2</i> *	<i>Metarhizium anisopliae</i>	* mutante apresenta virulência reduzida e superexpressão apresenta virulência aumentada, ambos contra <i>Dysdercus peruvianus</i> [Boldo <i>et al.</i> , 2009]
	CHIT42**		
	<i>chi3</i> *	<i>M. anisopliae</i>	* virulência reduzida contra <i>D. peruvianus</i> e aumento na expressão dos transcritos após choque térmico [Staats <i>et al.</i> , 2013]
	ChiA**	<i>A. nidulans</i>	** proteína ancorada a GPI, glicosilada e está localizada nos sítios de germinação do conídio, nas regiões de ramificações das hifas, nos septos e também no ápice das hifas (remodelamento da parede celular) [Yamazaki <i>et al.</i> , 2008]
	Mutante quíntuplo	<i>A. fumigatus</i>	* pequena diminuição no desenvolvimento do fungo durante a autólise (função nutricional na fase autolítica) [Alcazar-Fuoli <i>et al.</i> , 2011].
	<i>ech30</i> *	<i>T. atroviride</i>	* foi induzido na presença de <i>B. cinerea</i> em ensaios de confronto em placas [Klemsdal <i>et al.</i> , 2006].
	<i>chi18-13</i> *	<i>T. atroviridis</i>	* transcritos foram altamente expressos quando cultivados com parede celular e em ensaios de confronto com o fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i> [Seidl, 2005].

Continuação da Tabela A

	Endo T** (=Eng18A)	<i>T. reesei</i>	** apresenta atividade de deglicosilação de enzimas e não apresenta atividade de quitinase [Stals <i>et al.</i> , 2010].
B5	Eng18B*	<i>T. atroviride</i>	* mutante apresenta taxa de crescimento mais lenta em meio rico, tolerância aumentada ao estresse abiótico, maiores taxas de conidiação e micoparasitismo reduzido contra <i>B. cinerea</i> [Dubey <i>et al.</i> , 2012].
	Eng18B**		** proteína expressa em <i>E. coli</i> , purificada apresenta atividade de deglicosilação e demonstra envolvimento na via de degradação ERAD [Tzelepis <i>et al.</i> , 2014].
	Eng18A**	<i>T. atroviride</i>	** proteína expressa em <i>E. coli</i> , purificada apresenta atividade de deglicosilação [Tzelepis <i>et al.</i> , 2014].
	<i>tac1, tac2, tac3, tac4, tac5, tac6, tac7 e tac8*</i>	<i>T. atroviride</i>	* indução de todos estes genes durante o micoparasitismo contra <i>Beauveria bassiana</i> . [Gruber <i>et al.</i> , 2011a]. Além disso, foi sugerido que os genes <i>tac2</i> e <i>tac6</i> também podem estar envolvidos na formação de redes de hifas (<i>hyphal network formation</i>).
C	<i>tvc1</i> até <i>tvc15*</i>	<i>T. virens</i>	* reguladas diferencialmente em diferentes partes da colônia e induzidas por interações intra e interespecíficas [Gruber <i>et al.</i> , 2011b].
	<i>gh18-6*</i>	<i>Neurospora crassa</i>	* <i>gh18-6</i> foi induzido durante interações interespecíficas com <i>B. cinerea</i> e <i>F. sporotrichoides</i> sugerindo uma função na degradação da parede celular destes fungos antagonistas [Tzelepis <i>et al.</i> , 2012].
	<i>gh18-8*</i>	<i>N. crassa</i>	* apesar de também apresentar indução interespecífica, foi induzido mais fortemente em interação intraespecífica (hidrólise da parede celular endógena) [Tzelepis <i>et al.</i> , 2012].
	<i>gh18-9*</i>	<i>N. crassa</i>	* induzido em condição de estarvação e quando quitina foi utilizada como única fonte de carbono (hidrólise de quitina para aquisição de nutrientes) [Tzelepis <i>et al.</i> , 2012].

A nomenclatura dos genes (*) e das proteínas (**) é apresentada na tabela conforme indicado pelos autores nos respectivos trabalhos citados entre colchetes. Os dados apresentados se referem a fenótipos observados em linhagens mutantes para genes de quitinases ou de ENGases, além de perfis de expressão de alguns genes de quitinases. Os dados relativos as proteínas estudadas se referem a sua localização celular ou características de sua atividade enzimática detectada após purificação. Os micro-organismos que foram utilizados para estudar os genes da família GH18 estão devidamente listados. Os genes e proteínas foram separados conforme sua classificação nos subgrupos A, B, e C conforme Seidl *et al.* [2005] e no sg B5 conforme Karlsson & Stenlid [2008].

Com o objetivo de obter uma melhor compreensão dos experimentos realizados e das análises efetuadas, esta tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo 1 trata da análise genômica e do perfil transcricional dos genes da família 18 das glicosil hidrolases em *M. anisopliae*. O capítulo 2 trata da construção de vetores para a geração de mutantes nulos e posterior análise funcional dos quatro genes do subgrupo C das quitinases de *M. anisopliae*.

2. Objetivos

Em consequência da grande diversidade de quitinases presente em fungos filamentosos e do fato de que a função de cada uma dessas quitinases é desconhecida, nosso objetivo é a descrição funcional das quitinases pela caracterização da família multigênica de glicosil hidrolases GH18 em *M. anisopliae* e a construção de mutantes funcionais para as quitinases do subgrupo C. Este modelo de estudo é especialmente relevante pois as quitinases são, em princípio, fundamentais para o processo de nutrição, incluindo a invasão dos hospedeiros artrópodes, e de remodelamento da parede celular fúngica, pois este fungo apresenta diferenciação celular importante nas diferentes etapas de seu ciclo de infecção sendo necessárias várias alterações em sua parede celular composta por quitina.

Desenvolvimento experimental:

- ✓ Busca, identificação e caracterização das sequências gênicas contendo domínio GH18 no genoma de *M. anisopliae*;
- ✓ Predição de localização celular e de propriedades das proteínas GH18 preditas;
- ✓ Análise filogenética dos subgrupos A, B, C, D e E (ENGase) das proteínas GH18;
- ✓ Validação das predições pela detecção de transcritos por RT-PCR;
- ✓ Análise do perfil transcricional dos genes GH18 em diferentes condições de cultivo e tipos celulares por qPCR;
- ✓ Construção de mutantes funcionais para as quitinases do subgrupo C.

**Capítulo 1 – Genomic analyses and transcriptional profiles of glycoside hydrolase 18
family genes of *Metarhizium anisopliae***

Artigo encaminhado para publicação na revista PLOS ONE, submetido em 08/04/14
primeira revisão em 21/06/14, aceito em 19/08/14.

**Genomic Analyses and Transcriptional Profiles of the Glycoside Hydrolase Family 18
Genes of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae***

Short title: GH18 chitinase genes of *Metarhizium anisopliae*

Ângela Junges¹, Juliano Tomazzoni Boldo¹, Bárbara Kunzler Souza¹, Rafael Lucas Muniz Guedes², Nicolau Sbaraini¹, Lívia Kmetzsch¹, Claudia Elizabeth Thompson¹, Charley Christian Staats¹, Luis Gonzaga Paula de Almeida², Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos², Marilene Henning Vainstein¹, Augusto Schrank¹.

Affiliations:

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005
CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

² LNCC, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ, Brazil

***Corresponding author:** Augusto Schrank. Centro de Biotecnologia, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS,
Brazil.

Phone 55 (51) 3308-6079 / 55 (51) 3308 -6071

Fax 55(51) 3308 -7309

Email: aschrank@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Fungal chitin metabolism involves diverse processes such as metabolically active cell wall maintenance, basic nutrition, and different aspects of virulence. Chitinases are enzymes belonging to the glycoside hydrolase family 18 (GH18) and 19 (GH19) and are responsible for the hydrolysis of β -1,4-linkages in chitin. This linear homopolymer of N-acetyl- β -D-glucosamine is an essential constituent of fungal cell walls and arthropod exoskeletons. Several chitinases have been directly implicated in structural, morphogenetic, autolytic and nutritional activities of fungal cells. In the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*, chitinases are also involved in virulence. Filamentous fungi genomes exhibit a higher number of chitinase-coding genes than bacteria or yeasts. The survey performed in the *M. anisopliae* genome has successfully identified 24 genes belonging to glycoside hydrolase family 18, including three previously experimentally determined chitinase-coding genes named *chit1*, *chit2* and *chit3*. These putative chitinases were classified based on domain organization and phylogenetic analysis into the previously described A, B and C chitinase subgroups, and into a new subgroup D. Moreover, three GH18 proteins could be classified as putative endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidases, enzymes that are associated with deglycosylation and were therefore assigned to a new subgroup E. The transcriptional profile of the GH18 genes was evaluated by qPCR with RNA extracted from eight culture conditions, representing different stages of development or different nutritional states. The transcripts from the GH18 genes were detected in at least one of the different *M. anisopliae* developmental stages, thus validating the proposed genes. Moreover, not all members from the same chitinase subgroup presented equal patterns of transcript expression under the eight distinct conditions studied. The determination of *M. anisopliae* chitinases and ENGases and a more detailed study concerning the enzymes' roles in morphological or nutritional functions will allow comprehensive insights into the chitinolytic potential of this highly infective entomopathogenic fungus.

Keywords: GH18; chitinases; ENGases; multigene family; qPCR; *Metarhizium*.

Introduction

Chitin is ubiquitous in nature and is synthesized by a wide range of organisms being considered surpassed in abundance only by cellulose [1,2]. Chitin has an essential role in structuring biological composites, granting them structural shape and protective resistance. Chitin microfibrils, assembled by several N-acetyl- β -D-glucosamine subunits, serve as important structural constituents of cell walls from yeasts and filamentous fungi and exoskeleton from arthropods [1,3,4]. This linear homopolymer of N-acetyl- β -D-glucosamine can be hydrolyzed at β -1,4-linkages by the enzymatic action of glycoside hydrolase enzymes, the chitinases (E.C. 3.2.1.14) and the N-acetylglucosaminidases (E.C. 3.2.1.52). Chitinases are classified into two glycoside hydrolase families, GH18 and GH19, and N-acetylglucosaminidases belong to glycoside hydrolase family 20 (GH20) [5] (www.cazy.org). Both enzymes act in a synergistic and consecutive fashion to perform the complete enzymatic hydrolysis of chitin to N-acetylglucosamine (GlcNAc) [6]. Chitinases can also be classified by their mechanism of action. Generally, the endochitinases hydrolyze the chitin polymer at random internal chain points, while exochitinases release GlcNAc dimers (GlcNAc₂) from the non-reducing end. However, a novel GH18 exochitinase was described that releases monomers from the reducing end by a processive mechanism [7]. The endo- and exo- mode of action can occur in combination with processivity. Processive enzymes do not release the substrate after a successful cleavage, but slide through the active site to promote the next cleavage [8,9]. N-acetylglucosaminidases can act weakly on non-reducing ends of chitooligomers, but show preference for acting on diacetylchitobiose (GlcNAc₂), producing GlcNAc monosaccharides [3].

The two glycoside hydrolase families, GH18 and GH19, contain chitinases which display differences on amino acid sequences, conserved domains and 3D protein structures [10]. The GH18 family is widely distributed in all kingdoms, including viruses, bacteria, plants, fungi and animals [3]. Chitinases from the GH19 family are found mainly in plants [11], but they have also been described in bacteria, viruses and nematodes [12-14]. All fungal chitinases described thus far belong to the GH18 family, and this family is derived from an ancient gene family widely expressed in Archaea, Bacteria and Eukarya [15]. Besides chitinases, the GH18 family also contains endo- β -N-acetylglucosaminidases (EC

3.2.1.96), known as ENGases, which play a role in deglycosylation [5].

The number of chitinase genes displays a wide variation in fungal genomes, from a single gene in *Schizosaccharomyces pombe* up to 36 genes in *Trichoderma virens* [16]. Eighteen chitinase sequences were found in the *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) genome, and the chitinase domain composition was used to classify them into subgroups A, B and C [17]. Later, an expanded chitinase classification included bacteria, archaea, viruses, fungi, plants and animals [18]. Some of the different domains found in fungal chitinases to date are (i) the GH18 domain, containing the DxxDxDxE and S/AxGG conserved regions, (ii) the carbohydrate-binding module CBM18 (=ChBD, chitin-binding domain), (iii) the CBM1 (=CBD, cellulose/chitin-binding domain), (iv) the CBM50 (=LysM domain), and (v) a serine/threonine-rich region [4]. Recently, the entire genomes of different species from the genus *Metarhizium* were sequenced (*Metarhizium robertsii*, *Metarhizium acridum* and the teleomorphic state of *Cordyceps militaris*), and they were found to contain numerous chitinase genes [19,20]. These highly infective entomopathogenic fungi have the capability to differentiate into diverse cellular types (mycelia, conidia, appressoria and blastospores) during the host-infection cycle [21]. The fungal cell wall frequently undergoes remodeling as the cell expands and develops. Chitinases and chitin synthases act in remodeling the fungal cell wall in order to switch among these developmental cell types [22]. Beyond cell type modifications and cell wall remodeling, the potential fungal chitinase functions include exogenous chitin degradation as a nutrient source acquisition strategy and competition and defense against fungi and arthropods [4,23]. Functional analyses from fungal chitinases are expanding the roles assigned to the members of this multigene family. The most studied chitinase genes belong to subgroup A (sgA) and B (sgB), followed by chitinase genes from subgroup C (sgC), which are highly represented among *Trichoderma* species [24]. As reviewed by Hartl et al. [23], sgA is believed to contain enzymes involved in fungal growth and autolysis, sgB proteins seem to participate in nutritional and virulence functions, and sgC may have several roles in self and non-self chitin degradation.

In *M. anisopliae*, only two chitinase genes from sgB (*chi2* and *chi3*) were individually deleted, and both deleted strains showed diminished virulence in insect bioassays [25,26]. SgA proteins from *Trichoderma* and *Aspergillus* species were suggested to be involved in autolysis [27-29]. Members from sgC chitinases were initially studied in

Trichoderma spp., where the transcript profiles showed multiple induction conditions (during mycoparasitism, during hyphal network formation and by chitin) [24]. Recently, this subgroup was also analyzed in *A. nidulans*, and the sgC-II chitinases were suggested to be involved in fungal-fungal interactions [30]. Although several chitinases from filamentous fungi and yeasts have been isolated and characterized, the exact physiological functions of these enzymes remain to be determined. The assumption that the genes from the same subgroup present a corresponding functionalization may not reflect the biological purpose of the corresponding proteins. The alternative hypothesis that substrate accessibility is the principal factor determining chitinase activity also remains to be established [16]. Additionally, not only must mutant strains and chitinase expression levels be evaluated, but it is also necessary to clarify the function of these enzymes at the biochemical level because the evidence that they are all active is still lacking.

Here, we described a survey of the putative chitinase coding genes from one of the best-characterized fungal entomopathogens, *M. anisopliae*. On a genomic scale, we identified 21 new/unknown GH18 genes in addition to the three that were previously described, *chit1*, *chi2* and *chi3* [26,31-33]. An *in silico* analysis of those enzymes was performed, and they were subsequently classified as A, B, C as well as two novel subgroups, D (sgD) and E (sgE). The gene structures of the identified chitinases (sg A, B, C and D) and ENGases (sgE), including their conserved domain organizations, intron contents, and evolutionary histories were evaluated. The predicted GH18 domain-containing genes (hereafter called GH18 genes) were validated through transcript detection under different growth conditions. To gain information regarding the possible roles of these gene products in different cell types, the relative transcript levels from 23 GH18 genes were evaluated by quantitative RT-PCR (qPCR) under different conditions. These results open up new possibilities for studying the participation of chitinases in fungal biology and indicate the most relevant candidates for further functional analyses.

Materials and Methods

Fungal Strains and Culture Conditions

The *M. anisopliae* E6 strain used in all analyses was isolated from the insect *Deois flavopicta* in Brazil [34]. *M. anisopliae* E6 was cultured under eight different growth

conditions prior to RNA extraction. Conidia were harvested from cultures in agar plates and glass wool filtered to remove mycelium. *M. anisopliae* conidial suspensions (1×10^6 conidia.mL⁻¹) were inoculated into different culture media. Cove's Complete medium (MCc) composition was (w/v): 1 % glucose, 0.6 % NaNO₃, 0.15 % casein hydrolysate, 0.05% yeast extract, 0.2 % peptone, 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 (4 mg % Na₂Ba₄O₇•7H₂O, 40 mg % CuSO₄•5H₂O, 1 mg % FeSO₄, 80 mg % Na₂MNO₄•7H₂O, 80 mg % MnSO₄•7H₂O and 80 mg % ZnSO₄•7H₂O (w/v)). Minimum medium was composed of 0.6 % NaNO₃ (w/v) plus carbohydrate source (0.25 % N-acetylglucosamine (GlcNAc) (w/v) or 1 % crystalline chitin from crab shells) with Salts and Trace Elements Solutions. Cultures were maintained on a shaker (180 rpm) for 72 h at 28°C. Mycelium from autolysis induction medium (1 % glucose (w/v) and 0.6 % NaNO₃ (w/v) for 9 days) was also collected. For harvesting, the mycelia were abundantly washed with sterile dH₂O, filtered through Miracloth and frozen in liquid nitrogen for total RNA extraction. In addition to mycelial samples, total RNA from different cell types was extracted from conidia, blastospores and appressoria, and from 24 h fungal growth on *Rhipicephalus microplus* cuticles as an infection model. Appressoria induction was performed with 5×10^5 conidia.mL⁻¹ inoculated in 0.004 % yeast extract solution on 500 glass coverslips for 16 hours at 28°C. For blastospore production, 5×10^4 conidia.mL⁻¹ were cultured in ADAMEK medium (3 % Corn Steep Solids, 4 % glucose and 3 % yeast extract (w/v)) in a shaking platform for 64 hours at 28°C. Appressoria and blastospore induction was confirmed by observing randomly picked coverslips under a microscope (Figure S1). RNA extraction for all eight conditions was performed in three replicates. All reagents used were supplied from Sigma-Aldrich.

Chitinase Gene Biomining in the *M. anisopliae* Genome

M. anisopliae E6 pyrosequencing was performed at Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, RJ, Brazil), resulting in 23× genome coverage (Staats *et al.*, to be published elsewhere) (accession number PRJNA245858). The contigs resulting from the genome draft assembly were used to identify the GH18 genes with selected yeast and filamentous fungal chitinase sequences as queried in the tBLASTn program. The fungal species and their corresponding strains used in this search are listed in Table S1. All

sequences were extracted from the BROAD Institute and NCBI databases. First, we used 20 *T. reesei* amino acid sequences [17] to identify chitinases belonging to these microorganisms. Subsequently, each identified chitinase was used in the search for positive similarity in *M. anisopliae* contigs employing the tBLASTn algorithm with the BioEdit software [35]. The positively identified chitinases were screened for the presence of the GH18 family domain. The same screening methodology was applied using 91 reviewed fungal chitinase sequences extracted from the SwissProt database as well as the DxxDxDxE conserved domain.

To verify the presence of potential GH19 family proteins in the *M. anisopliae* genome, *Pringlea antiscorbutica* and *Arabidopsis thaliana* amino acid sequences (accession nos. AAP94636.1 and NP_188317.2, respectively) were also used in the previously described screening process.

GH18 Genes Sequence Analyses

The *in silico* identified GH18 genes were confirmed by comparing the predicted sequences obtained from *M. anisopliae* contigs to public databases. To categorize a predicted protein sequence as a chitinase or ENGase, it should exhibit the GH18 family domain with the two frequently detected regions S/AxGG and DxxDxDxE. The sequence may also exhibit other characteristic domains such as the carbohydrate-binding modules CBM18, CBM1 and CBM50 typically found on fungal chitinases. These CBMs were traditionally defined as chitin binding domain (ChBD, IPR001002), cellulose/chitin binding domain (CBD, IPR000254) or LysM domain (IPR018392) [4,36]. All domains were analyzed using the InterProScan [37], dbCAN [38] and CDD databases (Conserved Domain database) [39] provided by NCBI. The theoretical signal peptide cleavage site and the GPI anchor prediction for each protein were evaluated using the SignalP 4.1 server [40] and the big-PI Fungal Predictor software [41]. Theoretical isoelectric point and molecular mass values were obtained from the Compute pI/Mw software [42]. The ScanProsite server was used to detect the number of N-glycosylation sites. The number and positions of introns were predicted for each new chitinase by comparison with database chitinase sequences using BLASTx. The flanking regions were screened for the presence of canonical 5' and 3' splice sites. The positional insertion of these sequences among chitinases was also analyzed.

GH18 Proteins Phylogenetic Analyses

The *M. anisopliae* and *T. reesei* chitinase and ENGase amino acid sequences corresponding to mature proteins (excluding the signal peptide) or to the GH18 domain were aligned by the ClustalW software [43] using the BLOSUM matrix and additional default parameters. Phylogenetic trees were constructed in MEGA 6 [44], using the Neighbor-Joining algorithm [45], the pairwise deletion for the gap treatment and the p distance, Poisson and JTT matrices. The bootstrap test of phylogeny was performed with 1,000 repetitions. The OrthoMCL v2.0.8 [46] software was used with default parameters to identify the orthologs and paralogs of chitinases among *M. anisopliae* E6 and fifteen other predicted fungal proteomes: *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Beauveria bassiana* ARSEF 2860, *Cordyceps militaris* CM01, *Fusarium graminearum* PH-1, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1, *M. robertsii* ARSEF 23, *M. acridum* CQMa 102, *Magnaporthe oryzae* 70-15, *Neurospora crassa* OR74A, *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4, *Trichoderma atroviride* IMI 206040, *Trichoderma reesei* QM6a and *Trichoderma virens* Gv29-8. To infer the phylogenetic relationship among the three *Metarhizium* strains (*M. anisopliae* E6, *M. robertsii* ARSEF23 and *M. acridum* CQMa102) and *C. militaris*, a phylogenetic tree was constructed using the *tef-1-a* gene (Figure S2).

RNA Sample Preparation and Transcript Analyses

Total RNA from *M. anisopliae* cells obtained under different growth conditions was extracted by standard procedures using Trizol Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) on powder samples grinded on mortar and pestle with liquid nitrogen. Residual DNA was submitted to DNase treatment (Thermo Scientific, MA, USA) and, then, to an RNeasy Cleanup column (Qiagen, Hilden, Germany). One μg of total RNA, quantified on a Qubit fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), was used for cDNA synthesis using MMLV-RT enzyme (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The procedures were performed according to the manufacturers' instructions, and all RNA samples were stored at -80°C . To validate chitinase gene predictions, the transcript detection was accomplished by RT-PCR. RT-PCR primers for each chitinase gene were designed for the flanking intron sequences to observe differential band patterns

when compared to genomic DNA. Considering the conservation of chitinase genes, the design of oligonucleotides for PCR involved searching specific regions for each gene (Table S2).

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Experiments

All samples from the different conditions were analyzed in three biological replicates. NTC (no template control) and NRTC (no reverse transcriptase control) negative controls were included in each experiment. qPCR primers were designed using the Primer Premiere 6 software (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA, USA) and by selecting the “Avoid Cross Homology” tool option to obtain specificity and prevent designing primers in homologous sequence regions among members of the chitinase family (Table S2). γ -actin was used as the reference gene transcript (accession no. MANI05119). The transcript relative quantification from each gene was performed using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) with StepOne equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the StepOne 2.2 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The specificity from the synthesized products and the absence of primer dimers were visualized in melting curve analysis for each reaction. The amplification efficiency for each individual sample from MCc condition was calculated using LinRegPCR software application [47] and the mean efficiency values for each primer were added to Table S2. The same efficiency value was used for the quantification analysis. Transcript expression was calculated by analyzing Cq (quantification cycle) values and using $2^{-\Delta Ct}$ and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methods [48]. The results were processed in the GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) and GenePattern software [49] for graphics and statistical data acquisition, respectively. Statistical data were obtained by performing a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's multiple comparisons test ($P < 0.05$) to compare the $2^{-\Delta Ct}$ and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values of the eight experimental groups and to determine significant differences.

Results

The 24 *M. anisopliae* GH18 Genes can be categorized into Five Subgroups

The screening of *M. anisopliae* contigs using the 20 *T. reesei* chitinase and ENGase

protein sequences as queries allowed the identification of 26 positive hits. All other fungal sequences used as queries (including *M. robertsii*, *M. acridum* and *C. militaris* sequences) resulted in alignments with the same 26 previously detected contigs. Several other sequences showed diverse similarity levels with the query sequences. Nevertheless, only these 26 identified sequences included the GH18 domain, which is considered indispensable for chitinase categorization. By analyzing these sequences, 24 putative chitinase ORFs were identified, including the three previously isolated *M. anisopliae* chitinase genes (*chit1*, *chit2* and *chit3*) [31-33]. The GH18 domain was identified in all predicted genes using InterProScan, CDD and dbCAN. The two remaining sequences, although possessing the GH18 domain and other chitinase characteristics, presented several stop codons interrupting important coding regions and were therefore considered pseudogenes.

Based on the subgroup chitinase classification by Seidl et al. [17], 20 out of the 24 predicted GH18 proteins could be attributed to subgroups A, B and C. The *M. anisopliae* chitinase categorization was performed by domain detection and alignment analysis against *T. reesei* classified chitinases. A phylogenetic tree of the 24 *M. anisopliae* and 20 *T. reesei* chitinases and ENGases was constructed (Figure S3). Most of the *M. anisopliae* chitinases clustered with corresponding *T. reesei* chitinase subgroups A, B and C. Of the 24 predicted chitinases, nine were assigned as subgroup A, seven were assigned as subgroup B, and four were assigned as subgroup C. Moreover, four remaining GH18 proteins were grouped in a separated branch and one of them presented higher similarity with *T. reesei* chi18-15, which was not included in subgroup A, B or C and was not added to the phylogenetic trees constructed by Seidl et al. [17]. Later, although chi18-15 was not assigned as part of a specific fungal subgroup, it was shown to be near subgroups B-V and B-I by Karlsson & Stenlid [50]. The other three proteins in this separated branch grouped with GH18 enzymes characterized as ENGases [51]. In *M. anisopliae* GH18 proteins classification, the protein ortholog to *T. reesei* Chi18-15 was assigned to a new subgroup D following the existing classification, and the three proteins similar to ENGases were assigned to a new subgroup E (Figure S3). Two major branches can be observed in Figure S3, one including subgroups A and C and another clustering subgroups B, D and E. *M. anisopliae* putative chitinases were named ChiMaAs (ChiMaA1 to ChiMaA9), ChiMaBs (ChiMaB1 to ChiMaB7), ChiMaCs (ChiMaC1 to ChiMaC4) and ChiMaD (ChiMaD1); and

chima was used for the gene nomenclature. The three putative ENGases were named MaEng18A, MaEng18B and MaEng18C according to their *Trichoderma* orthologs. A tBLASTn search for potential GH19 chitinase domains using two amino acid sequences from the GH19 family as queries did not render any hits within the *M. anisopliae* contigs, suggesting the absence of this plant-chitinase family.

The structural domains frequently found in chitinases – GH18, CBM18, CBM1 and CBM50- were also detected in *M. anisopliae* predicted proteins by using the Conserved Database Domain (at the NCBI server), dbCAN database and InterProScan software. The GH18 domain, which is conserved in these enzymes, was found in all predicted chitinase sequences as well as in ENGase sequences (Figure 1). This domain contains the two conserved regions, DxxDxDxE and S/AxGG, corresponding to the catalytic and substrate binding regions, respectively (Figure S4). Amino acid alignment showed that all chitinases have a glutamate (E) residue in the conserved region DxxDxDxE, which has been shown to be essential for catalytic activity [52]. The absence of this specific residue is characteristic of chitolectins, chitin-binding proteins that are not able to hydrolyze the glycoside bond. The three aspartate residues (D) were also highly conserved, except for ChiMaB1 and MaEng18A (1st aspartate residue) and ChiMaA2 (3rd aspartate residue). The substrate-binding region S/AxGG showed a serine (S) or an alanine (A) for 21 out of the 24 GH18 proteins, except for sgE proteins, MaEng18A, MaEng18B and MaEng18C, which exhibit a methionine (M) residue (Figure S4). GH18 was the only domain exhibited by sgA and sgD chitinases and by sgE ENGases. A CBM1 domain lying at the protein C-terminal end was detected on only two (ChiMaB1 and ChiMaB4) out of seven sgB chitinases (Table 1). Seidl [4] observed that *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* and *Trichoderma* spp. have several sgB chitinases with a CBM1 domain. For instance, four out of five *T. reesei* sgB chitinases presented the CBM1 domain, but *Aspergillus* spp. do not spams as many CBM1 domains as *T. reesei* sgB chitinases does. The same is observed for *M. anisopliae* sgB chitinases. One of the sgB chitinases (ChiMaB7) presented a large (approximately 326 amino acids) serine and threonine-rich domain. This ser/thr-rich domain was also found in other fungal chitinases and may take part in protein folding [4] or may be involved in the membrane localization (GPI anchor) of this protein. The high molecular mass chitinases from sgC (>120 kDa) exhibited multiple CBM50 domains. Three out of four sgC chitinases have one to three CBM50 domains in their sequences,

which are thought to bind to peptidoglycan-like and chitin oligosaccharides [53]. Another carbohydrate-binding domain detected in sgC chitinases was the CBM18, containing eight cysteine residues, which may form disulfide bonds. Those extra carbohydrate-binding domains are thought to enhance substrate-enzyme coupling, but the exact contribution to the enzyme activity/function is still unknown. As analyzed by Gruber et al. [24], sgC chitinases have two types of domain organization. In *M. anisopliae* sgC chitinases, ChiMaC1, C2 and C3 have the first type of architecture, with the GH18 domain localized in the middle of the sequence, and ChiMaC4 has the second type, characterized by an N-terminal location of the GH18 domain and no CBM50 domain. One CBM24 domain, never before reported in GH18 chitinase sequences, was detected using dbCAN annotation tool. The CBM24 seems to bind α -1-3 glucans and it is present in α -1-3 glucanases [54]. The CBM24 domain was found at the C-terminal region of ChiMaC3.

M. anisopliae GH18 Protein Properties and Predicted Subcellular Localization

The predicted *M. anisopliae* E6 GH18 ORFs were characterized by *in silico* prediction tools, based on the sequence length, molecular mass and isoelectric point. The protein lengths ranged from 306 to 1,556 amino acids and 33.02 to 168.76 kDa. Fifteen out of 24 predicted proteins presented $pI < 6.0$, four presented $pI > 7.0$ and five presented pI at approximately 6.0 (Table S3). These data are in agreement with the vast diversity of lengths observed for chitinases: 27 to 190 kDa and pI between 3.0 and 8.0, as previously reviewed [3]. The chitinases from sgC are larger than the proteins from the other subgroups. Predicted localization signals and post-translational modification of the 24 *M. anisopliae* GH18 proteins were also evaluated. The localization analysis included the presence of signal peptides, transmembrane regions, GPI-anchors and amino acid regions recognized by non-classical secretion pathways. Nineteen out of 24 predicted protein sequences contained a theoretical signal peptide and corresponding cleavage sites (Figure 1, Table 1). The signal peptide sequences presented a hydrophobic central domain and an alanine residue at position -1, as is characteristic of eukaryotes [55,56]. At least one member of each subgroup (except sgD) did not present signal peptide sequences (ChiMaA2, A4, ChiMaB5, ChiMaC2 and MaEng18B). The presence of signals for GPI anchors was evaluated using the Big-PI Fungal Predictor software. Only one chitinase presented a potential GPI-modification site (ChiMaB7) (Table 1). Additionally, the

subcellular prediction analyzed by WolfPSORT showed that ChiMaA2, which has no evidence of a signal peptide, might be located at the mitochondrial matrix, similarly to its ortholog chi18-3 from *T. reesei* [17]. Finally, post-transcriptional modifications were predicted for *M. anisopliae* chitinases, and the predicted proteins showed high levels of glycosylation (Table S3).

Intron Analyses in Chitinase Genes

Intron prediction considering the number, length and position was performed using BLASTx. All chitinase genes from sgC and most genes from subgroups A and B contain introns. However, sgD and sgE genes are not interrupted by intron sequences (Figure 1), as is the case for the ChiMaA8, A9, B5 and B6 sequences. Subgroups A and B presented averages of 2.7 and 2.4 introns per gene, and sgC showed a higher intron content (4.25 introns/gene), which agrees with the increased length of the genes exhibited by this subgroup. Intron length values were not stable for all sequences. Intron sequences were longer in sgC genes (ca. 100 nt) than in subgroups A and B (68 and 78 nt, respectively). All introns exhibited the canonical 5' (5' GU) and 3' (AG 3') splice sites on flanking regions. The intron positions are depicted in Figure 1. Analysis of the intron positional insertion was performed by comparison among chitinase sequences. It was observed that, for the majority of the genes, intron positions were not conserved among subgroups, although a noticeable pattern of intron insertion near the region containing the catalytic conserved active site was identified. This catalytic site appears to be interrupted by an intron in four genes (A2, A5, A7 and B2) and flanked by an intron in another four genes (A3, B7, C1 and C3). Considering other insertion positions, the majority of introns is placed before this catalytic site at the N-terminal region. Finally, all introns contained in ChiMaB3 and B4 showed very similar intron positions, while ChiMaA5 and A7 exhibited identical intron positions (Figure S5).

Phylogenetic Analyses grouped GH18 Protein Orthologs into Five Distinctive Subgroups

All alignments were obtained using only the GH18 domains because the additional regions of the genes showed high levels of variability. Similar procedures were applied in previous studies [50]. *M. robertsii*, *M. acridum* and *C. militaris* GH18 protein sequences were compared to *M. anisopliae* predicted proteins. The resulting phylogenetic tree

displayed the same subgroup arrangement that was identified when comparing *M. anisopliae* to *T. reesei* chitinases (Figure S3). Two main clades were obtained, one including the A and C subgroups and the other formed by the B, D and E subgroups (Figure 2). The number of GH18 proteins detected in the *M. anisopliae* genome was intermediate (24 proteins) when compared to *M. robertsii* (28 proteins), *M. acridum* (19 proteins) and *C. militaris* (19). The chitinase sequences from *M. robertsii* and *M. acridum* were more closely related to *M. anisopliae* proteins than to *C. militaris* proteins. Considering these three anamorphic species, not all chitinase members were detected in the three species. Six out of nine sgA chitinases were present in the three species, while ChiMaA6 and A7 were absent in *M. acridum*, and ChiMaA3 was absent in *M. robertsii*. Six out of seven members from sgB are shared among species. Moreover, *M. acridum* lacks ChiMaB5, and *M. robertsii* has an exclusive member (accession no. EFY94586). *M. anisopliae* lacks four sgC proteins present in *M. robertsii*, whereas two of these sequences seem to be pseudogenes. The sgD protein was present in the four species (ChiMaD1); and *M. acridum* lacked sgE MaEng18C, and *C. militaris* lacked MaEng18A and MaEng18C.

The OrthoMCL analysis identified orthologs and paralogs among fungal genomes and allowed the construction of four phylogenetic trees based on subgroup classification. The sgA phylogenetic tree (Figure 3) displayed four branches equivalent with A-II, A-III, A-IV and A-V clades described by Seidl and Karlsson & Stenlid [17,18]. Clades A-II and A-V present three *M. anisopliae* chitinases, clade A-III present two chitinases and clade A-IV only one chitinase. Clade A-V ChiMaA1 (CHIT42) orthologs are the most studied chitinases in several fungi. Clade A-II contains the only chitinase paralogs detected by OrthoMCL, ChiMaA5 and A7.

Four well-supported major ramifications (clades B-I, B-II and B-III) can be observed in the sgB phylogenetic tree containing the seven *M. anisopliae* chitinase members (Figure 4). Clade B-I contains four sgB chitinases, the two closely related ChiMaB5 and B6, and also the Ser/Thr-rich chitinase ChiMaB7 and ChiMaB1. The two CBM1-containing chitinases are in this tree, ChiMaB1 and B4, in separate clades, B-I and B-II, respectively. The two previously studied chitinases from *M. anisopliae*, CHI2 and CHIT30 (ChiMaB1 and B2) were placed in this subgroup.

The SgC phylogenetic tree showed two major clades (Figure 5), the clade C-I with only one sgC member, ChiMaC4 and the clade C-II with the closely related ChiMaC1, C2

and C3. ChiMaC1, C2 and C3 have CBM50 domains, which are absent in the C4 chitinase, and the GH18 domain is located at the N-terminal protein region, whereas this domain has a central position in the sequences of the other three ChiMaCs. Although the division in clades C-I and C-II relates to the domain composition found in these proteins, only the GH18 domain was used to construct the tree, indicating that this domain *per se* also contains divergences. The sgC phylogenetic tree showed that *M. anisopliae* contains only four members, while *M. robertsii* has eight sgC chitinases. This subgroup has been shown to be highly overrepresented in *Trichoderma* spp., with 9 sgC chitinases in *T. atroviride* and 15 in *T. virens* [16]. Excluding *Trichoderma* species and *A. nidulans* [30], these high molecular mass chitinases remain poorly characterized.

A phylogenetic tree from the novel proposed subgroups D and E was also constructed and displayed three well-supported clades, D-I, E-I and E-II (Figure 6). Clade D-I contains ChiMaD1 and *T. reesei* chi18-15, clade E-I contains MaEng18B, and clade E-II contains MaEng18A and MaEng18C. Recently, orthologs from MaEng18A and MaEng18B (Eng18A and Eng18B from *T. reesei* and *T. atroviride*, as well as *Flammulina velutipes*) were proven to have a role in protein deglycosylation rather than chitinolytic activity [51,57,58]. GH18 proteins from these subgroups were not previously studied in *M. anisopliae*.

Transcript Validation and Relative Expression Analyses Display Variable Transcript Profiles for Chitinase and ENGase Genes

Two methods (RT-PCR and qPCR) were used for transcription validation of *M. anisopliae* putative chitinases and ENGases. RNA was extracted from different cell types under different culture conditions: mycelium grown on glucose, chitin, GlcNAc or autolysis conditions; and induced blastospores, conidia, induced appressoria and 24 h fungal growth over tick cuticles. The last gene to be detected (*MaEng18A*) was absent from the transcriptional analyses, which were performed before its later detection. First, chitinase transcripts were detected by RT-PCR, and 19 out of 23 putative chitinase and ENGase genes produced detectable amplicons, including all members from subgroups A, B, D and E (Figure 1). However, SgC chitinase transcripts could be only detected by qPCR analysis. MCc and autolysis were the growth conditions where the higher number of GH18 transcripts was detected, with 17 and 16 GH18 transcripts, respectively. Conidia presented

only four detectable chitinase transcript species (*chimaA7*, *A8*, *B4* and *MaEng18B*). As previously reported [59], the *chimaB1* gene (*chi2*) presented two forms of transcripts that could be detected in MCc, GlcNAc, autolysis and blastospore-inducing conditions. Moreover, two other chitinase genes (*chimaA2* and *chimaB2*) presented more than one potential transcript. These two different transcripts were detected in induced fungal germ tubes and appressoria. Secondly, transcript levels were also analyzed by qPCR. Single peak denaturation curves indicated primer specificity for each reaction. The 23 putative GH18 gene transcripts were detected in at least one of the different *M. anisopliae* cell types and culture conditions, validating the proposed annotation. The relative transcription levels of GH18 genes in comparison with γ -actin using $2^{-\Delta Ct}$ method were displayed in Figure 7 in order to highlight only the most pronounced transcripts and also to detect any pattern of regulation among the tested conditions (Figure 8). The most pronounced relative transcript levels from each subgroup were associated with the following genes: (i) *chimaA1* and *chimaA7*; (ii) *chimaB1*, *chimaB4*, *chimaB5* and *chimaB7*; (iii) *chimaC4*; and (iv) *chimaD1* and *MaEng18C* (Figure 7). *ChimaA1* showed high transcript levels with chitin and GlcNAc conditions and *chimaA7* showed high transcript level with MCc condition. Among sgB chitinases, *chiMaB7* showed significantly higher transcript levels than all other genes in the three conditions most related to infection (blastospores, tick cuticles and appressoria), and *chimaB4* exhibited pronounced transcript levels in chitin 1 % and GlcNAc cultures. SgC chitinases presented lower transcript levels compared to all other chitinase transcripts. *chimaD1* presented higher transcript levels with the mycelia conditions. A HeatMap representation of the transcript levels coupled to a hierarchical clustering of the growth conditions was obtained in order to group conditions with similar expression profiles (Figure 8). Among the analyzed conditions, the cell types (conidia, appressoria, blastospores and growth on tick cuticles) presented lower relative transcript levels, and the mycelia cultures with MCc, chitin 1 % and GlcNAc 0.25 % presented the most elevated levels of transcripts. Moreover, a closer proximity among chitin 1 %, GlcNAc 0.25 % and autolysis conditions could be observed, with which transcript levels were higher.

When chitinase expression in conidia was used as a control condition for the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analysis method (Figure S6A to S6D), all sgB chitinases were shown to be induced by chitin 1 %, although at different levels. Chitin provided higher induction for *chimaB1*, *B2*,

B3, *B4* and *B6*. Despite also being induced by chitin, *chimaB5* was more highly induced in complete medium, and *chimaB7* was more highly induced by the two conditions most related to infection: tick cuticles and blastospores. In general, excluding *chimaB7*, chitinases in this subgroup presented lower transcript levels with blastospore, appressoria and tick cuticle conditions compared to transcript levels with conidia. Conversely, chitin in the culture medium was not as strong an inducer of sgA chitinases as it was for sgB. Only three out of nine chitinases of sgA displayed higher transcript levels in the presence of chitin (*chimaA1*, *A6* and *A8*). *ChimaA5* was most strongly induced in appressoria, and *chimaA7* and *A4* were most strongly induced with complete media culture. *ChimaA2* did not show significantly different levels of transcripts between conditions, which is a pattern previously reported regarding its orthologous gene *chi18-3* in *T. reesei*. The autolysis condition did not show any significant induction of sgA chitinases, but seemed to induce *chimaB3* and *C2* gene expression. *ChimaC1* and *C4* showed higher transcript levels with complete media culture, and *chimaD1* and *MaEng18B* showed higher transcript levels with GlcNAc culture.

Discussion

The relevance of chitinolytic enzymes in fungi is reflected in the number of members included in this multigene family, which is represented as one of the largest family groups among glycoside hydrolases in fungal genomes [60]. Fungal genomes contain diverse multigene families, which are multiple genes with a common origin, encoding similar or identical products that may exhibit the same function or may have diverged to acquire other functions [61]. Therefore, understanding the specific functions of each member of a multigene family, as well as comparing genes among fungal species, provides important information for characterizing gene families. Using birth and death evolutionary model, Karlsson & Stenlid [50] showed that the fungal chitinase family evolved non-randomly, and they were able to identify fungal lineages with expansions and contractions in the number of chitinase gene members.

Thus far, there have been no detailed studies correlating subgroup categorization, phylogenetic inferences and expression data for *M. anisopliae* GH18 genes. A total of 24 GH18 genes, all containing the characteristic GH18 domain, are present in the *M. anisopliae* genome and were detected by a genomic survey using amino acid chitinase

sequences from *Metarhizium* spp., *T. reesei* and other fungi as queries in tBLASTn screenings. These genes had detectable transcripts, validating their functionality. GH18 genes and their coding sequences were analyzed in detail by identifying their characteristic properties. Twenty out of 24 GH18 genes belong to subgroups A, B and C, as previously identified for *T. reesei* chitinases, but four *M. anisopliae* genes are grouped into a separated branch. Therefore, we propose to classify them as subgroups D and E. The characteristic properties from the predicted GH18 proteins and their gene structures were detected, and this multigene family from *M. anisopliae* exhibited a range of variation in the aspects considered.

Isoelectric point prediction analysis showed that most of the potential chitinases and ENGases are acidic enzymes (Table S3). According to Pinto et al. [62], *M. anisopliae* acidic enzymes can cleave only GlcNAc oligomers containing more than four residues, which classify them as endochitinases, while basic isozymes act as exochitinases. The high number of acidic enzymes is in agreement with previous studies, in which only one out of eighteen *T. reesei* chitinases and one out of fifteen *Chaetomium globosum* chitinases were predicted to be alkaline enzymes [17,63]. In *M. anisopliae*, four GH18 proteins were predicted to be alkaline: ChiMaA2, A6, B7 and MaEng18A. A glycol chitin containing SDS-PAGE [33,64] also resulted in multiple overlapping degradation bands co-localized between 45 and 66 KDa, which is in accordance with the number of predicted acidic chitinases. Although most of these enzymes have molecular masses below this range, some post-translational modifications may alter the estimated MW in SDS-PAGE. Indeed, *T. reesei* chitinases showed glycosylation modifications that may influence the migration pattern and cause distortions in SDS-PAGE [65]. The predicted *M. anisopliae* chitinase glycosylation sites obtained from the *in silico* analysis (an average of 3,4 sites of glycosylation / protein) corroborates the previous experimentally demonstrated band pattern. Because most of the *M. anisopliae* chitinase and ENGase sequences are predicted to have a signal peptide sequence (19/24), this indicates that the secretory pathway is very important for this class of enzymes, as already described for chitinases from other fungi [4]. Moreover, it was possible to detect regions recognized by non-classical secretion pathways in three out of five chitinases that do not contain a signal peptide. ChiMaA4 and C2 are the only chitinases to which it was not possible to assign any secretory characteristic. Only three *M. anisopliae* chitinases were experimentally identified thus far

in culture supernatants: CHIT42 (ChiMaA1), CHI2 (ChiMaB1) and CHIT30 (ChiMaB2) [25,66]. Santi *et al.* [67] detected chitinase activity in *M. anisopliae* intact conidial extracts, indicating that some chitinases may be localized at the spore surface. Chitinase CHIT42 (ChiMaA1) was also detected at the spore surface by immunoproteomic analysis [68].

The analysis of chitinase gene structure revealed two intron positional patterns. The prevalent position of introns upstream of the catalytic site in chitinase genes matches the strong 5' bias in the intron positions already described in fungal genomes [69]. The second pattern was the insertion position of intron sequences interrupting and surrounding the catalytic site. The presence of an intron sequence in this position may favor the occurrence of sequence modifications. The high positional conservation of introns shared by ChiMaA5 and A7 agrees with the OrthoMCL analysis of orthologs and paralogs and classifies these two chitinases as paralogous. Because ChiMaB1 exhibited two transcripts characterized by the removal or retention of the second intron [59], we examined the intron content of ChiMaA2 and ChiMaB2, which presented two bands in RT-PCR experiments (Figure 1). There is an in-frame stop codon at the beginning of the third intron on ChiMaA2, and this could lead to a smaller transcript while not altering the composition of domains in this protein as suggested for ChiMaB1. Otherwise, ChiMaB2 presents only one intron, and it is positioned interrupting the chitinase catalytic domain. It also contains an in-frame stop codon at the beginning of the intron that, if considered as the correct stop signal, would produce a smaller protein with no domains. The ChiMaB2 chitinase intron sequence and length remains to be further studied before the exact composition of the observed transcripts can be determined. The post-transcriptional regulation of chitinase genes was also already shown for *T. atroviride*. *M. anisopliae chimaB1* produced two forms of transcripts detected under MCc, GlcNAc, autolysis and blastospore conditions and *chimaA2* and *chimaB2* presented the same occurrence under conditions inducing fungal germ tubes and appressoria. The corresponding *chi18-3* and *chi18-13* orthologs in *T. atroviride* also showed similar transcript patterns [17].

The phylogenetic analyses grouped various chitinase and ENGase orthologs and paralogs that were separated into five distinctive subgroups, A, B, C, D and E. Taking into account the tree containing only *Metarhizium* spp. and *T. reesei*, we could observe the four well-supported clades and the known distribution of subgroups into closely related

subgroups A and C and subgroups B and the proposed subgroups D and E. The subgroup A tree reveals the orthology among several fungal species, and most of the *M. anisopliae* sgA chitinases are also present in the *M. robertsii* and *M. acridum* genomes, although *M. robertsii* lacks A3, and *M. acridum* lacks both A6 and A7. It is worth noting that sgA has one pair of paralogous chitinases (ChiMaA5 and A7), with A7 absent in both *M. acridum* and *C. militaris* but present in *M. robertsii*. The presence of this protein in *M. robertsii* suggests that the gene duplication may have occurred before the separation of these two species.

The sgB phylogenetic tree contains ChiMaB1 and B2 (CHI2 and CHIT30), for which mutants were already shown to diminish *M. anisopliae* virulence against *D. peruvianus* [25,26]. Therefore, if based on their presence, this subgroup may contain other important chitinases related to pathogenesis and potential targets for knockout experiments. The chitinases grouped with ChiMaB7 also have ser/thr-rich regions and are GPI-anchored, like both ChiA from *A. nidulans* [70] and ChiA1 from *A. fumigatus*. The glycosylated and GPI-anchored ChiA from *A. nidulans* is located at hyphal branching sites and hyphal tips and has therefore been proposed to be involved in cell wall remodeling at both cell sites [70]. A quintuple mutant lacking all sgB chitinases was constructed in *A. fumigatus*, but no growth or germination defects were observed, suggesting that this family is not crucially involved in the morphogenesis of this fungus. It was suggested that sgB chitinases in *A. fumigatus* might play a nutritional role during autolysis because a slight growth decrease was detected with that condition [71].

The sgC genes are less represented in *M. anisopliae* (4 genes) than in *M. robertsii* (8 genes) or the teleomorph *C. militaris* (5 genes), and *M. acridum* presents even fewer genes (3). Regarding the four additional sgC chitinases present in *M. robertsii* genome, *M. anisopliae* does not have orthologous sequences for two of these genes but does have interrupted orthologs for the other two genes. These two sequences are believed to represent pseudogenes from sgC chitinases given that, except for the presence of multiple stop codons, these two sequences match those of sgC chitinases (EFZ03350 and EFZ03083) from *M. robertsii*. Pseudogenes are nonfunctional genes generated by nonsense mutations, frameshift mutations or partial nucleotide deletions [72]. The two putative C pseudogenes contain 18 and 5 stop codons interrupting the putative *M. anisopliae* coding sequences when compared to *M. robertsii* sequences. By analyzing the

alignments between these sequences, possible frameshift errors in *M. anisopliae* sequencing were discarded because the amino acids interpolated by the stop codons showed identical correspondence to the orthologous sequences from *M. robertsii*. This large correspondence throughout the sequences would not occur in a frameshift error where most of the amino acid composition would be impaired. Consequently, these two pseudogene sequences seem not to be sequencing artifacts but were generated by nonsense mutation. All 24 GH18 sequences are distributed into different contigs except for one of the sgC pseudogene sequences, which is grouped closely to other sgC genes. As observed in *Trichoderma* species, sgC proteins have large dissimilarities outside the GH18 and CBM domains, and the ORFs automatically predicted by the genome annotation were incorrect outside these conserved regions, so their sequences were analyzed in deeper detail. We could observe that some of the sgC chitinase sequences available on the NCBI databases from both *M. robertsii* and *M. acridum* genomes have discrepancies in some regions. The protein sequences EFY97746 and EFY97747 from *M. robertsii* (*M. acridum* sequences EFZ86352 and EFZ86353) correspond to only one *M. anisopliae* sgC protein (ChiMaC3) and lack a region between these sequences. Chitinases from this subgroup are better studied in *A. nidulans* and in mycoparasitic *Trichoderma* species [24,30]. The number of chitinase members in this genus is higher than in other fungal genomes, whereas *T. atroviride* has 9 sgC genes, and *T. virens* has 15 sgC genes, indicating that *M. anisopliae* most likely did not exhibit an expansion like those observed in *Trichoderma*, *Gibberella* and *Uncinocarpus* spp. Moreover, the two putative pseudogenes also indicate that expansion was not important for *M. anisopliae*.

The phylogenetic tree from the proposed subgroups D and E is divided into three major clades separating ChiMaD1 from MaEng18A, MaEng18B and MaEng18C. The classification of these genes into different subgroups was considered based on the amino acid alignments and phylogenetic tree construction. The amino acid sequences that compose this group of proteins were sufficiently distinct to separate these sequences from all other chitinase sequences, as shown by the phylogenetic trees in Figures 2 and S3. The sgD ChiMaD1 is orthologous to Chi18-15 from *T. reesei*, which was reported as acquired by a Hypocreales ancestor by horizontal transfer from *Streptomyces* [17]. This protein did not group with any *T. reesei* chitinases in its first description [17], and it was classified between subgroups by Karlsson & Stenlid [18]. ChiMaD1 enzyme probably acts as a

chitinase because of the confirmed chitinolytic activity exhibited by the *B. bassiana* Bbchit1 ortholog [73].

Five fungal ENGases from the GH18 family (orthologous with the three *M. anisopliae* ENGases described) were already characterized and their deglycosylation enzymatic activity was confirmed in *T. reesei*, *T. atroviride* and *F. velutipes* [51,57,58]. Although firstly assigned to sgB5 our data shows that the branch separation originated by the phylogenetic analysis is a strong and reliable indication that these protein sequences are very different from sgB proteins. Enzymatic assays to evaluate chitinase activity were also performed in *Trichoderma* ENGases and these enzymes do not exhibited chitinolytic activity [51,57]. If these proteins are indeed not true chitinases and are actually deglycosylation enzymes, it seems even more plausible to group them in a separated subgroup or even family. To be classified in the subgroup E, these sequences had to present a clustering pattern that separates them in a ramification independent from subgroup B. The only domain included in the sgE (ENGases) and the sgD proteins is the GH18 domain, and there are no sgD or sgE proteins with CBM18, CBM1 or CBM50 domains that are characteristic of subgroups B or C. SgD and sgE proteins are also differentiated by the absence of introns in all members from these subgroups.

The transcription analyses from the chitinase genes validated the predicted sequences, and their relative expression displayed variable transcript profiles under several conditions. The transcription profile of 23 chitinases was examined in *M. anisopliae* at different stages of development: conidia, mycelia (culture medium added of either chitin, GlcNAc, glucose or induced autolysis), appressoria, blastospores and an infection condition (cultures on tick cuticles). The detection of transcripts of each of the 23 GH18 genes in at least one of these conditions validates our gene predictions from the annotated genome. The relative expression levels of chitinases in the three cell types tested (conidia, appressoria and blastospores) were less representative than in the growth conditions in which mycelium was obtained. This lower representativeness may be related to the diminished metabolic activity of resting cells such as conidia. Additionally, blastospores are cell types found in host hemolymph, and at this stage, the fungus has already transposed the chitinous exoskeleton and is using trehalose as a carbon source, being chitinase expression not required. In the appressoria induction condition, the low chitinase transcript representativeness was not expected because the appressorium is a specialized

penetration structure that helps to dissolve the host chitinous exoskeleton. These cells use enzyme secretion and physical pressure to mediate penetration but, before penetrating, the appressoria must promote adhesion. To adhere to hydrophobic surfaces, the fungal cell releases adhesion proteins (adhesins and other proteins from the extracellular matrix). It may be that the appressoria cells induced over glass coverslips are at a stage of adhesion where the secretion of chitinases had not yet occurred. In fact, it is known that chitin synthases are essential for promoting appressorium formation because a mutant for one of these genes, *chs7* from *M. oryzae*, was unable to form appressoria on artificial hydrophobic surfaces [74]. The cell wall from the appressoria must be rigid enough and dense enough with chitin fibers to support the process of high turgor generation. As observed in *Colletotrichum graminicola* appressoria, the use of the Nikkomycin Z chitin synthase inhibitor impaired the ability to withstand the necessary turgor pressure [75]. MCC growth cultures, which contain glucose as carbon source, are regarded as a repression condition for chitinase gene expression. Many transcript levels from all chitinase subgroups were high with this condition as much as with the GlcNAc 0.25 % and chitin 1 % induction cultures. The chitinase expression levels observed in glucose may be due to active fungal growth and the production of mycelial mass that requires chitinases to remodel the fungal cell wall (hyphal branching). As a general overview, there was no common expression profile for all chitinase genes, even when considering members within the same chitinase subgroup.

These differential expression profiles indicate an absence of a common induction/repression expression pattern attainable by all GH18 family members in *M. anisopliae*, suggesting that they may not have totally redundant roles. Redundancy is the most common explanation for multigene families. However, the diversity of the expression profiles may indicate different functions. The importance of individual chitinases has been suggested by our previous results, showing that the knockout of a single chitinase gene (*chimaB1* or *chimaB2*) significantly affects insect infection by *M. anisopliae* [25,26]. Chitinases A5 and B7 represent good candidates for a more detailed analysis involving *M. anisopliae* virulence against its hosts because those two genes were the most expressed in conditions related to infection.

Figure Legends

Figure 1. Modular domain structure and transcripts from *M. anisopliae* GH18 genes. **A)** GH18 genes exhibit characteristic conserved domains with different compositions. Coding exonic sequences are depicted as boxes (color codes are indicated) and introns as thin lines. Domains were identified using Conserved Database Domain (at NCBI), dbCAN and InterProScan. Signal peptide sequences were predicted using SignalP 4.1. Blank protein regions indicate the absence of characterized domains. Horizontal semi-arrows indicate oligonucleotide positions and directions used for transcript validation. **B)** The validation of GH18 genes was achieved by transcript detection (+ or – on V column) with RNA extracted from seven different culture conditions in RT-PCR reactions using specific primers shown by the semi-arrows on panel A. The length of PCR products is displayed as bp and compared to C+ (genomic DNA as template) and C- (no template added). RNA extracted from: **M1** - mycelium grown in complete medium (MCc); **M2** - mycelium grown in **induction GlcNAc 0.25%** medium; **CO** - **conidia** suspension; **M3** - mycelium under **autolysis**; **AP** - from cultures under **appressorium** induction; **GT** - from cultures under **germ tube** formation induction; **BL** - from cultures in **blastospore** induction medium. # indicates alternative transcript forms detected.

Figure. 2: Phylogenetic relationships among GH18 domain-containing proteins and subgroup divisions in three *Metarhizium* strains and *Cordyceps militaris*. Amino acid sequences corresponding to GH18 domains from *M. anisopliae* chitinases and ENGases (marked as ▲), *M. acridum* (MAC), *M. robertsii* (MAA) and *C. militaris* (CCM) were obtained from the NCBI databases. The Neighbor-Joining (1,000 bootstraps) phylogenetic tree was constructed using Mega 6 after ClustalW alignment. The scale bar indicates the genetic distance, which is proportional to the number of amino acid substitutions.

Figure 3. Phylogenetic tree of GH18 subgroup A chitinases. Chitinase amino acid sequences from *M. anisopliae* and other fungi were from the NCBI and BROAD Institute databases. The Neighbor-Joining (1,000 bootstraps) phylogenetic tree was constructed using Mega 6 after alignment obtained from ClustalW. *M. anisopliae* chitinases are indicated as ▲ with their corresponding ID numbers.

Figure 4. Phylogenetic tree of GH18 subgroup B chitinases. Chitinase amino acid sequences from *M. anisopliae* and other fungi were from the NCBI and BROAD Institute databases. The Neighbor-Joining (1,000 bootstraps) phylogenetic tree was constructed using Mega 6 after alignment obtained from ClustalW. *M. anisopliae* chitinases are indicated as ▲ with their corresponding ID numbers.

Figure 5. Phylogenetic tree of GH18 subgroup C chitinases. Chitinase amino acid sequences from *M. anisopliae* and other fungi corresponding to the GH18 domain were from the NCBI and BROAD Institute databases. The Neighbor-Joining (1,000 bootstraps) phylogenetic tree was constructed using Mega 6 after alignment obtained from ClustalW. *M. anisopliae* chitinases are marked as ▲ with their corresponding ID numbers.

Figure 6. Phylogenetic tree of the GH18 subgroup D (chitinase) and subgroup E (ENGases). Amino acid sequences from *M. anisopliae* and other fungi were from the NCBI and BROAD Institute databases. The Neighbor-Joining (1,000 bootstraps) phylogenetic tree was constructed using Mega 6 after alignment obtained from ClustalW. *M. anisopliae* chitinases/ENGases are marked as ▲ with their corresponding ID numbers.

Figure 7. Relative chitinase and ENGase transcript profiles in *M. anisopliae*. Transcriptional profiles from 21 chitinase and 2 ENGase genes in eight different conditions using actin as the reference gene are displayed. The different cell types and culture conditions analyzed were mycelium grown on glucose, chitin 1 %, GlcNAc 0.25 % or autolysis conditions; and also induced blastospores, conidia, induced appressoria and 24 h fungal growth over tick cuticles. Data are shown as the mean \pm SD from three experimental replicates of three biological replicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 8. HeatMap and hierarchical clustering of the eight analyzed conditions by similar expression profiles. The HeatMap and hierarchical clustering were analyzed using GenePattern databases at BROAD Institute. The hierarchical clustering was used to group conditions (and not genes) by similar expression profiles. The highest transcript values are displayed as the reddest (hot), the lowest values are displayed as the bluest (cool), and intermediate values are a lighter color of either blue or red ($2^{-\Delta C_t}$) for chitinase/ENGase in different conditions. Conditions are the same as in Figure 7.

Tables

Table 1: Properties of the 24 *M. anisopliae* glycoside hydrolase family 18 genes (GH18 genes).

Identification	Sg	Signal P	CBMs	GPI or NCS	Mature protein theoretical kDa	Accession number
ChiMaA1 (<i>chit1</i>)*	A	+	-	-	44.12 (42)	MANI7345
ChiMaA2	A	-	-	+ NCS	38.60	MANI3521
ChiMaA3	A	+	-	-	42.62	MANI22967
ChiMaA4	A	-	-	-	44.18	MANI12760
ChiMaA5	A	+	-	-	38.78	MANI5739
ChiMaA6	A	+	-	-	43.49	MANI29841
ChiMaA7	A	+	-	-	39.36	MANI730
ChiMaA8	A	+	-	-	41.67	MANI21851
ChiMaA9	A	+	-	-	41.20	MANI6991
ChiMaB1 (<i>chi2</i>)*	B	+	-	-	41.96 (42)	MANI2801
ChiMaB2 (<i>chi3</i>)*	B	+	CBM1	-	32.16 (30/32.4)	MANI4755
ChiMaB3	B	+	-	-	32.71	MANI26679
ChiMaB4	B	+	CBM1	-	42.95	MANI4417
ChiMaB5	B	-	-	+ NCS	33.02	MANI21602
ChiMaB6	B	+	-	-	33.30	MANI18482
ChiMaB7	B	+	-	+ GPI	80.63	MANI12994
ChiMaC1	C	+	CBM18 and 3 CBM50	-	148.23	MANI23684
ChiMaC2	C	-	CBM18 and 2 CBM50	-	127.58	MANI19486
ChiMaC3	C	+	CBM18, 2 CBM50, CBM24	-	168.76	MANI10050
ChiMaC4	C	+	CBM18	-	125.68	MANI30406
ChiMaD1	D	+	-	-	33.81	MANI18860
MaEng18A	E	+	-	-	38.57	MANI23769
MaEng18B	E	-	-	+ NCS	37.58	MANI9126
MaEng18C	E	+	-	-	34.33	MANI30302

M. anisopliae chitinase and ENGase identification, accession numbers, subgroup classification and molecular mass are given. The presence of predicted signals and carbohydrate-binding motifs (CBM) detected on the 24 GH18 proteins are marked as positive (+). These include presence of signal peptides (SignalP), GPI-anchors (GPI) and regions recognized by non-classically secretion pathways (NCS). Proteins marked with * were previously studied in *M. anisopliae* E6, as shown in references 25, 26, 31-33.

Acknowledgments

We thank the two anonymous reviewers for their critical and detailed analysis that improved the final version of the manuscript. This study was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do RJ (FAPERJ).

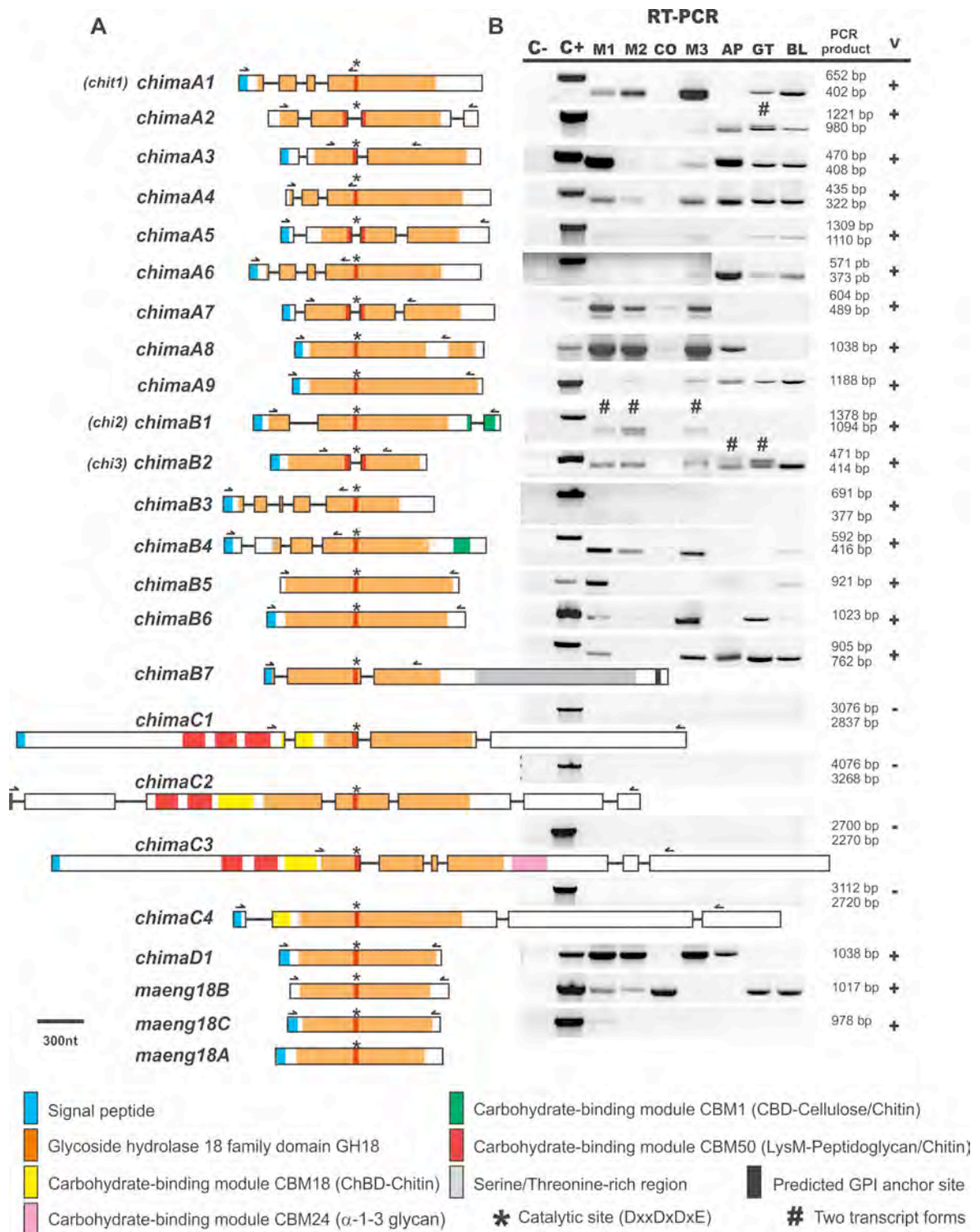


Figure 1

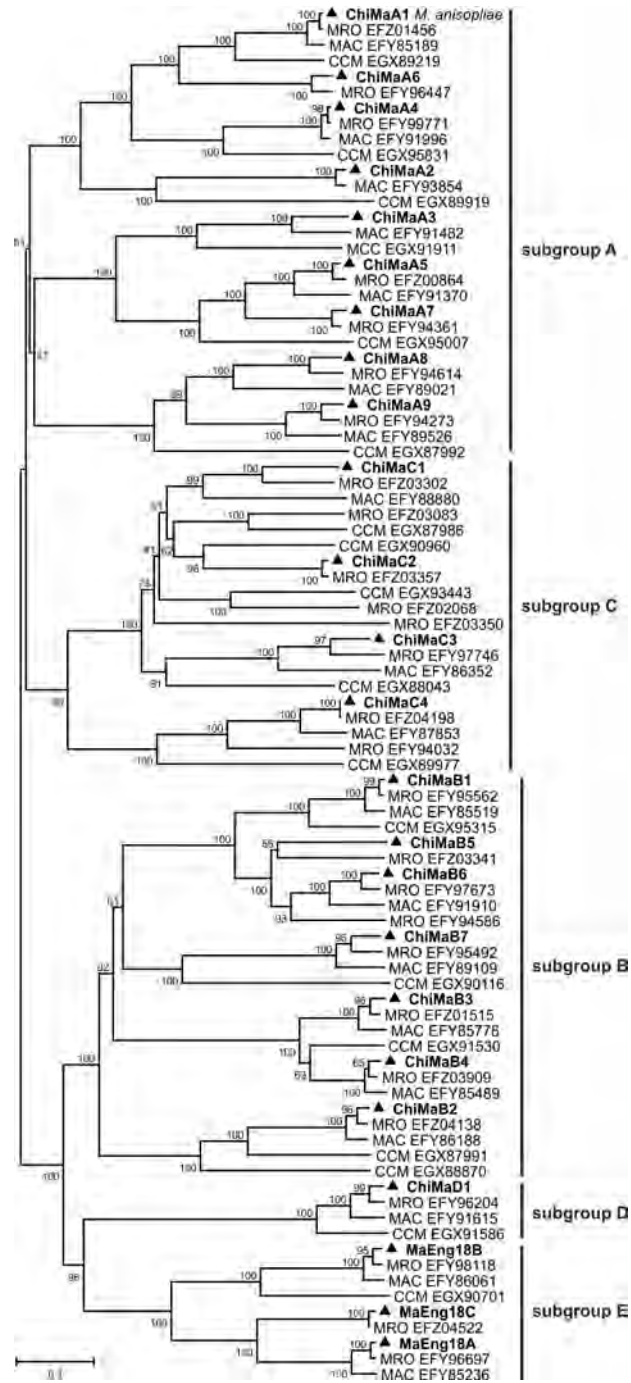


Figure 2

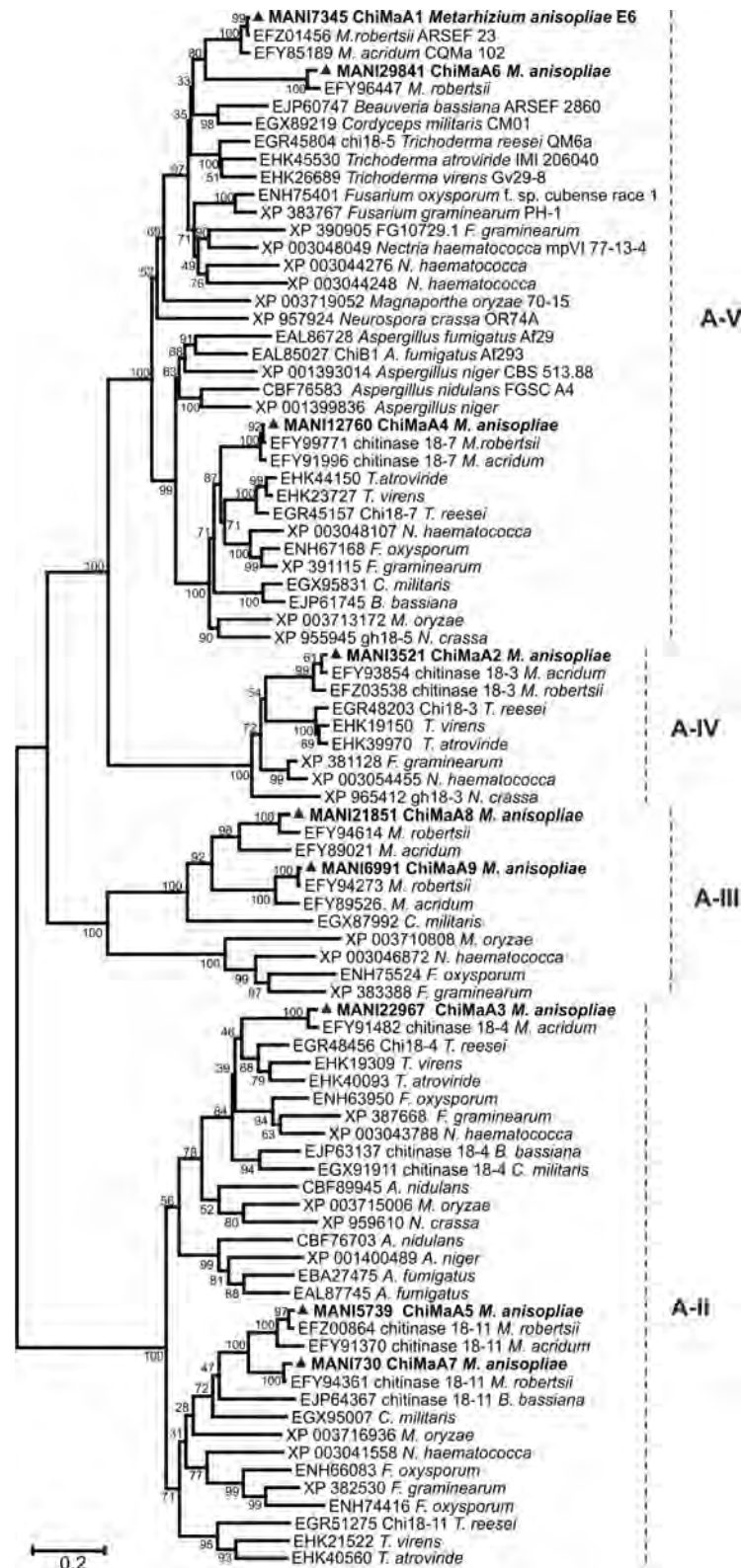


Figure 3

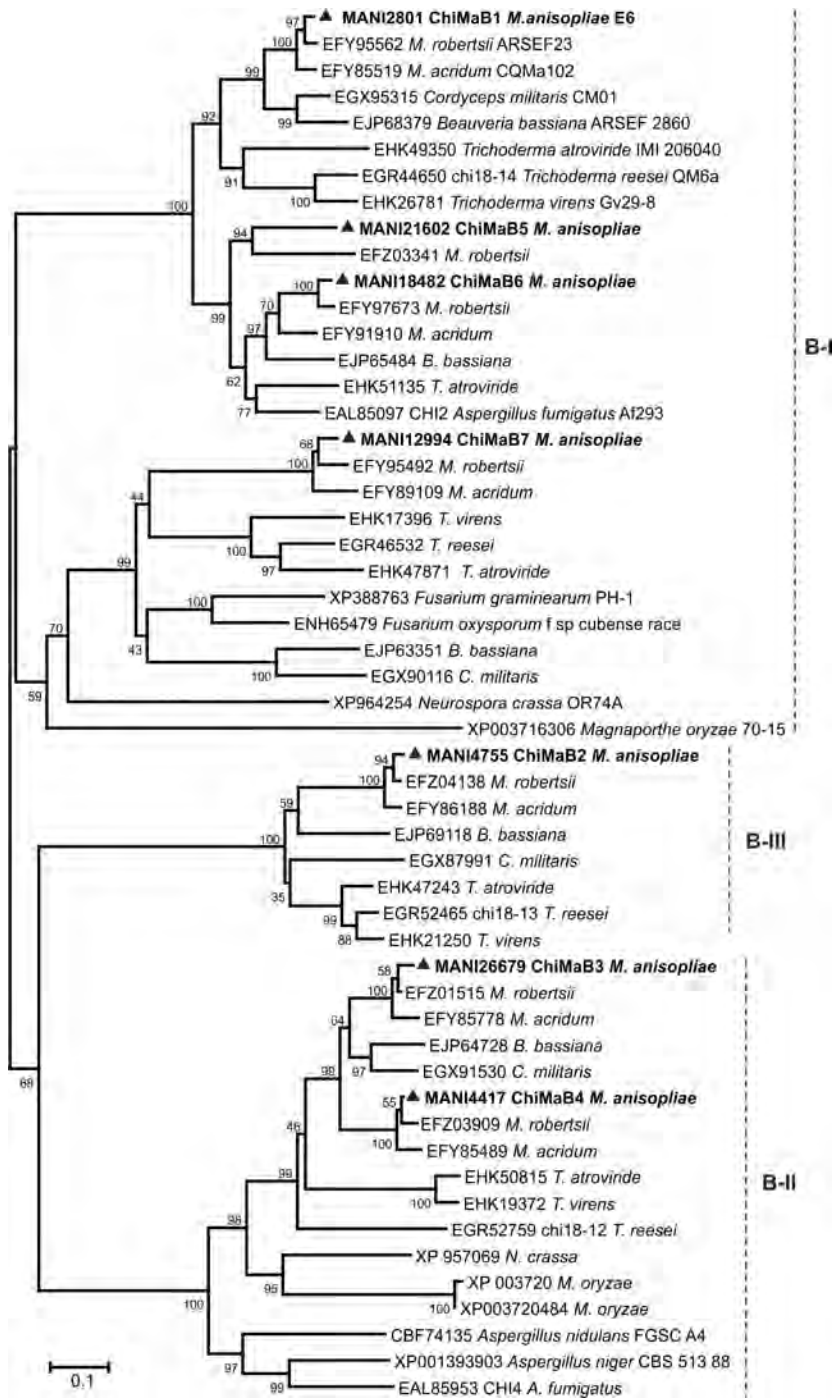


Figure 4

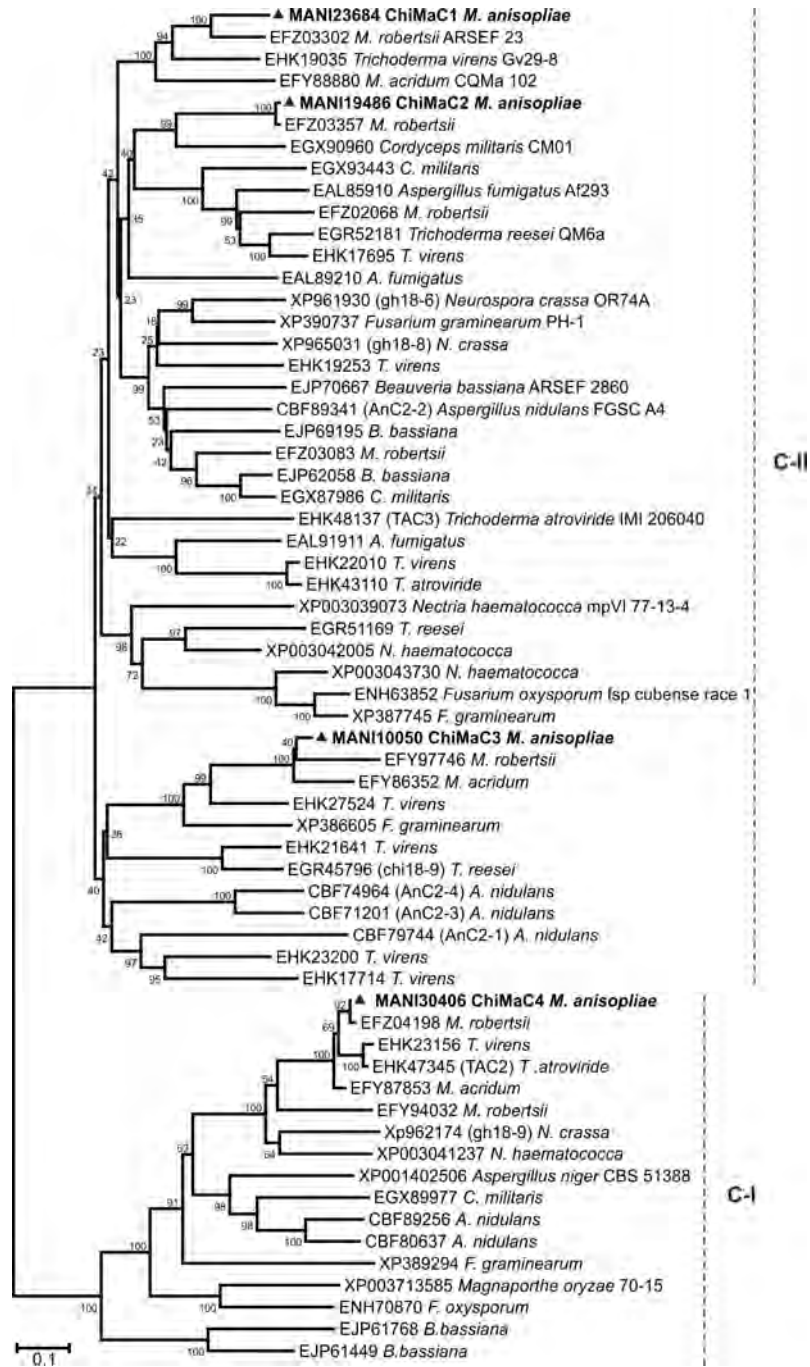


Figure 5

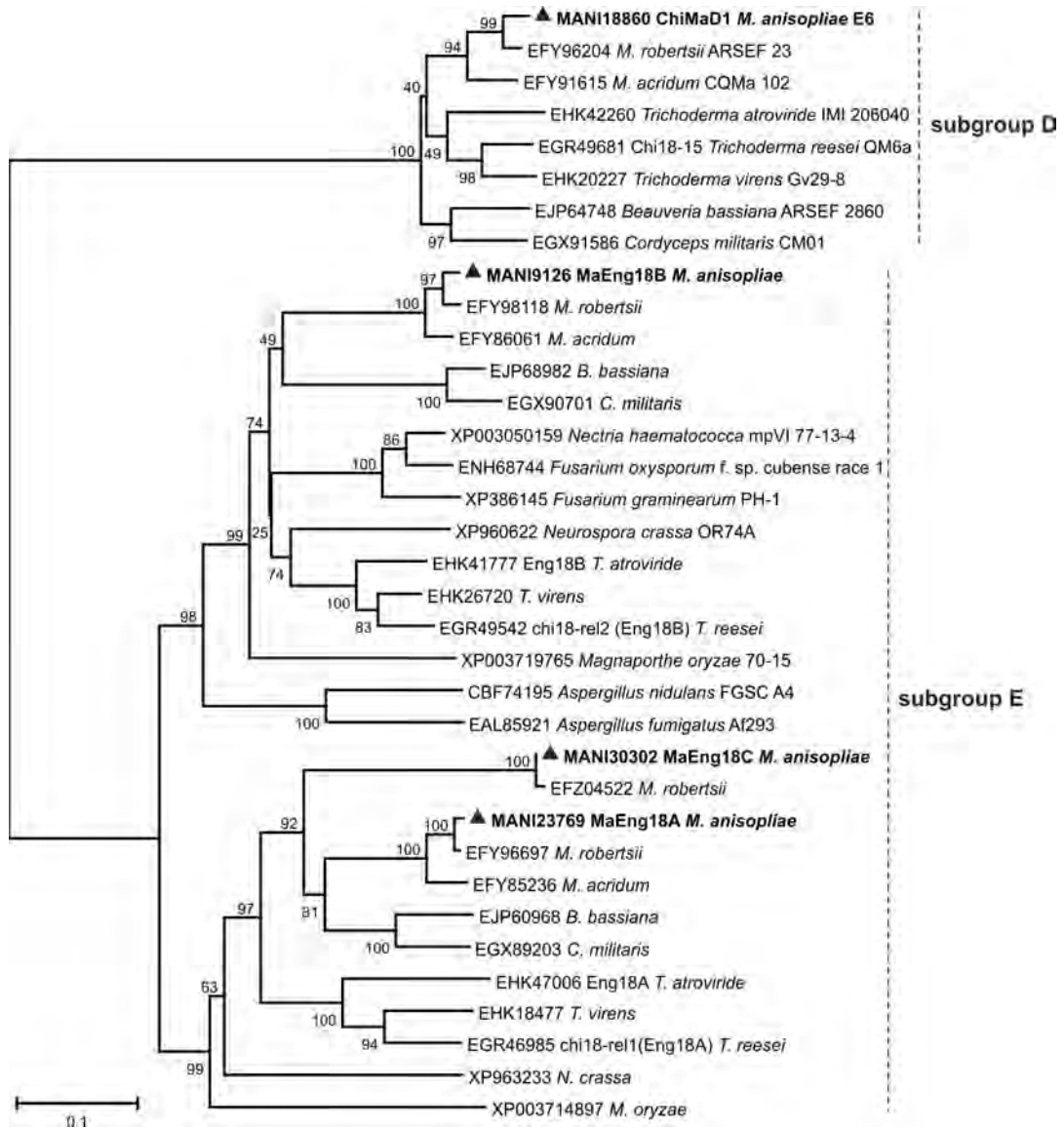


Figure 6

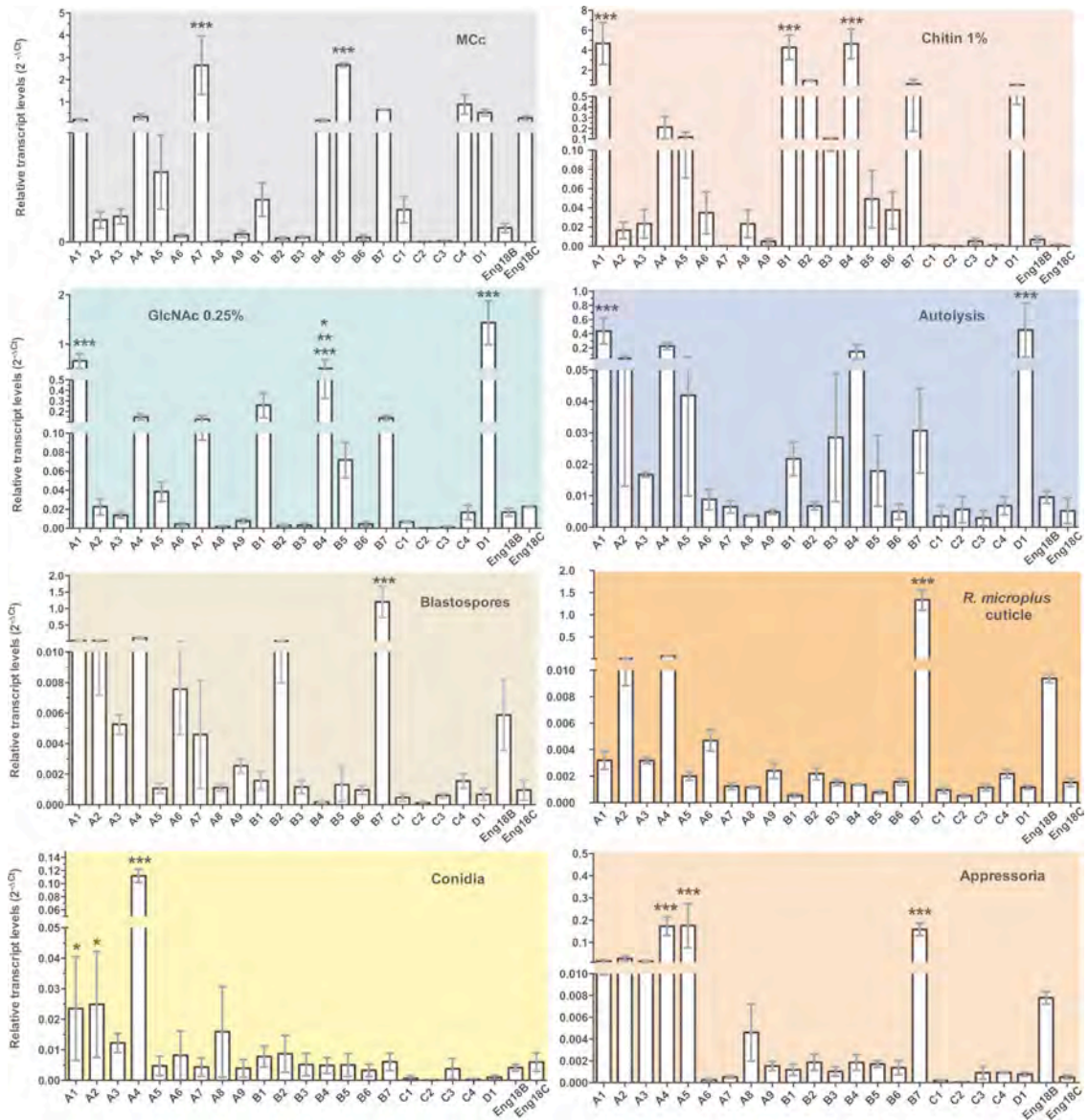


Figure 7

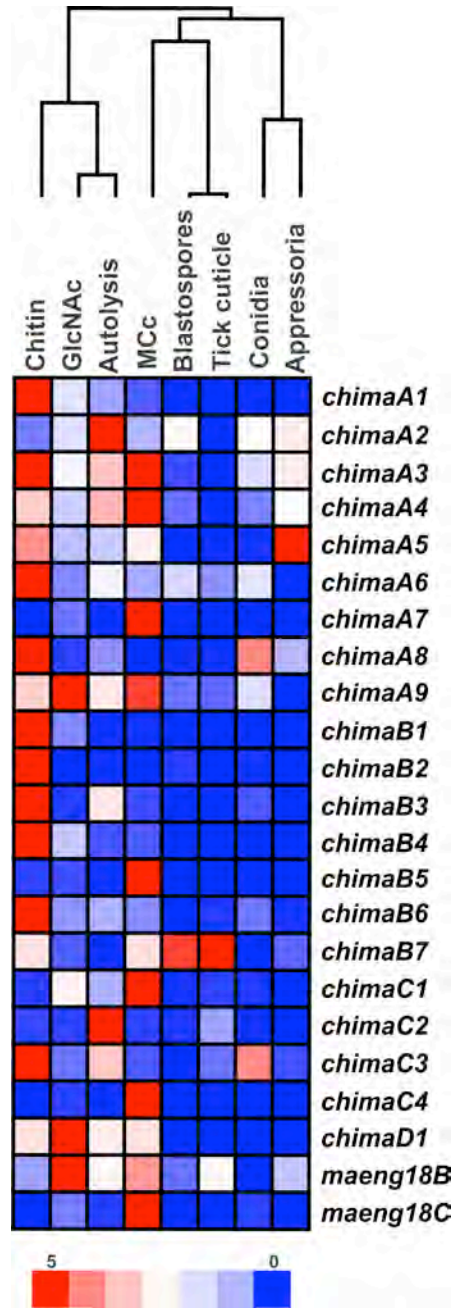


Figure 8

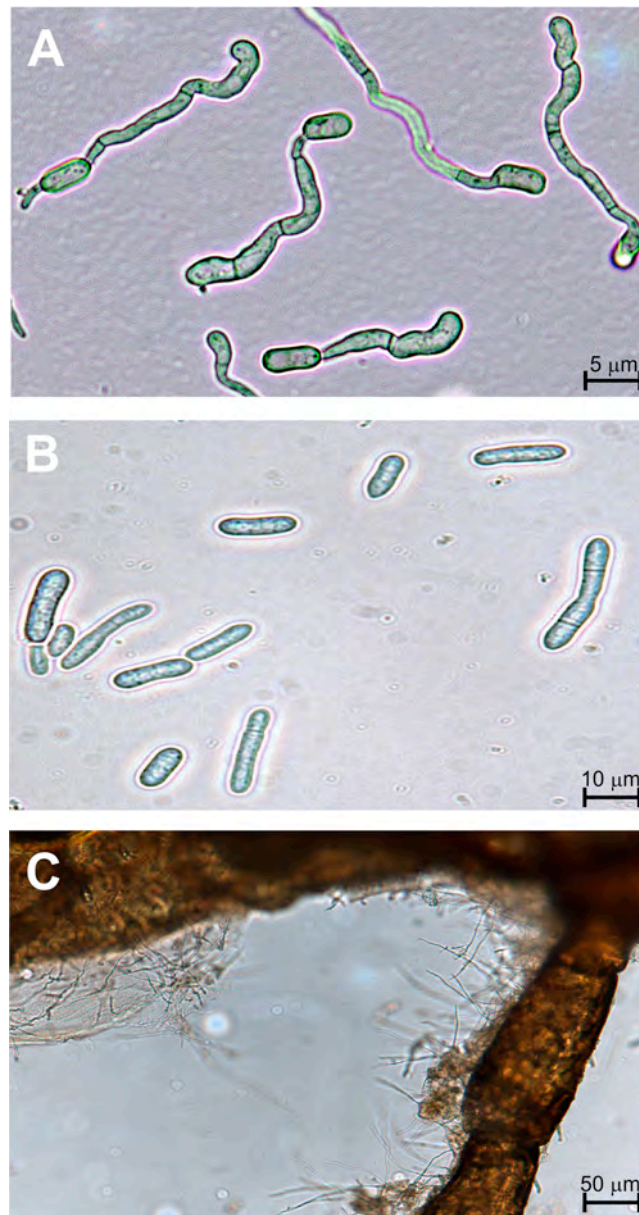
Supporting Information:

Figure S1: *M. anisopliae* cell types analyzed in this work.

A) *M. anisopliae* appressoria induced over glass coverslips; B) *M. anisopliae* blastospore induction; C) *M. anisopliae* growth over *R. microplus* cuticle.

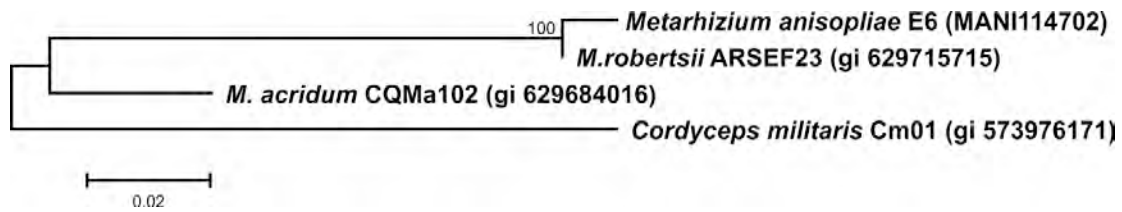


Figure S2: Evolutionary relationships of *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. acridum* and *Cordyceps militaris*.

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method conducted in MEGA6 software. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The analysis involved nucleotide sequences of the 5' region of the *tef-1-alpha* gene.


```

          . **          : * . *
ChiMaA8  TKVLVSVGGWTG  HNLDGIDFDWEYPGQ
ChiMaA9  SKVLVSIIGWWSG  YKLDGIDIDWEFPGR
ChiMaA7  TKVCMAIIGWGD  LGYDCVDVDWEYPPG
ChiMaA5  -KVCMAIIGWGD  LGYDCIDVDWEYPPG
ChiMaA3  TKVMVAVGGWGD  TGADGVDIDWEYPPG
ChiMaA1  MKTMLSIGGWTW  WGF DGIDVDWEYP--
ChiMaA6  MKLLISIGGWTW  WGF DGIDLWEYP--
ChiMaA4  LKVLLSIGGWTY  LGFDGIDIDWEYP--
ChiMaA2  LOVVLSIGGGAC  SGLDGIDIAWEYP--
ChiMaB6  K-VLLSLGGA--  SVDGWDFDIESNAG
ChiMaB5  K-VIISLGG--  FVDGWDFDIESNSG
ChiMaB1  K-IVLSLGA--  FVNGFDFDIEVNGG
ChiMaB7  K-VLLAIGGAHI  VSDGFDLDLED RTP
ChiMaB3  KTIVLSLGGAT-  VVDGFD FDFESTTN
ChiMaB4  KTIILSLGGAT-  VVDGFD FDFEASTN
ChiMaB2  KPVILSMGGATD  VKLDGVDLDNETNDG
MaEng18B K-VLLMLGGAAP  NLDGVDLDVEEP--
MaEng18C K-VMGMIGGAAP  ELDGLDIDVEQP--
MaEng18A K-IMGVGGGAAP  KLQGLDIDVEQP--
ChiMaD1  ATIVMSIGGATA  YNFDGVDIDIEAGLS
ChiMaC1  VKKIISFGGWDF  HGLDGVDLDWEYPGA
ChiMaC2  VKKILAFGGWTF  NELDGVDIDWEYPAA
ChiMaC3  VKRILSLGGWAY  EGIDGVDIDWEYPGA
ChiMaC4  LKIWVALGGWCS  FNFDGVDIDWEYPVA

```

Figure S4: Presence of the conserved domains S/A/MxGG and DxxDxDxE in *M. anisopliae* predicted chitinases and ENGases.

Amino acid sequences were aligned at ClustalX, amino acid background colors follow Clustal default definition. * - indicates 100% conserved residues.

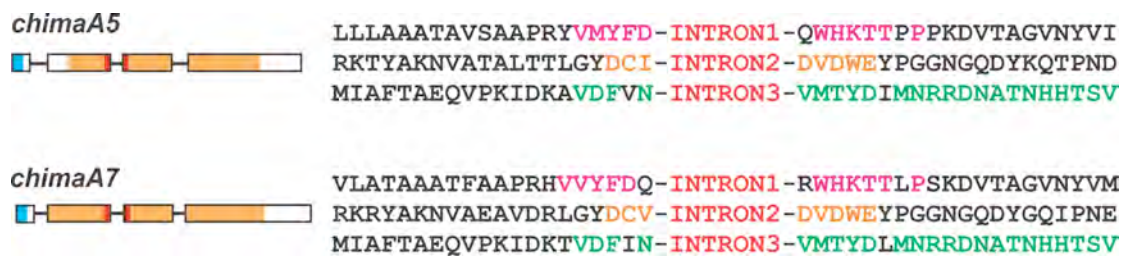
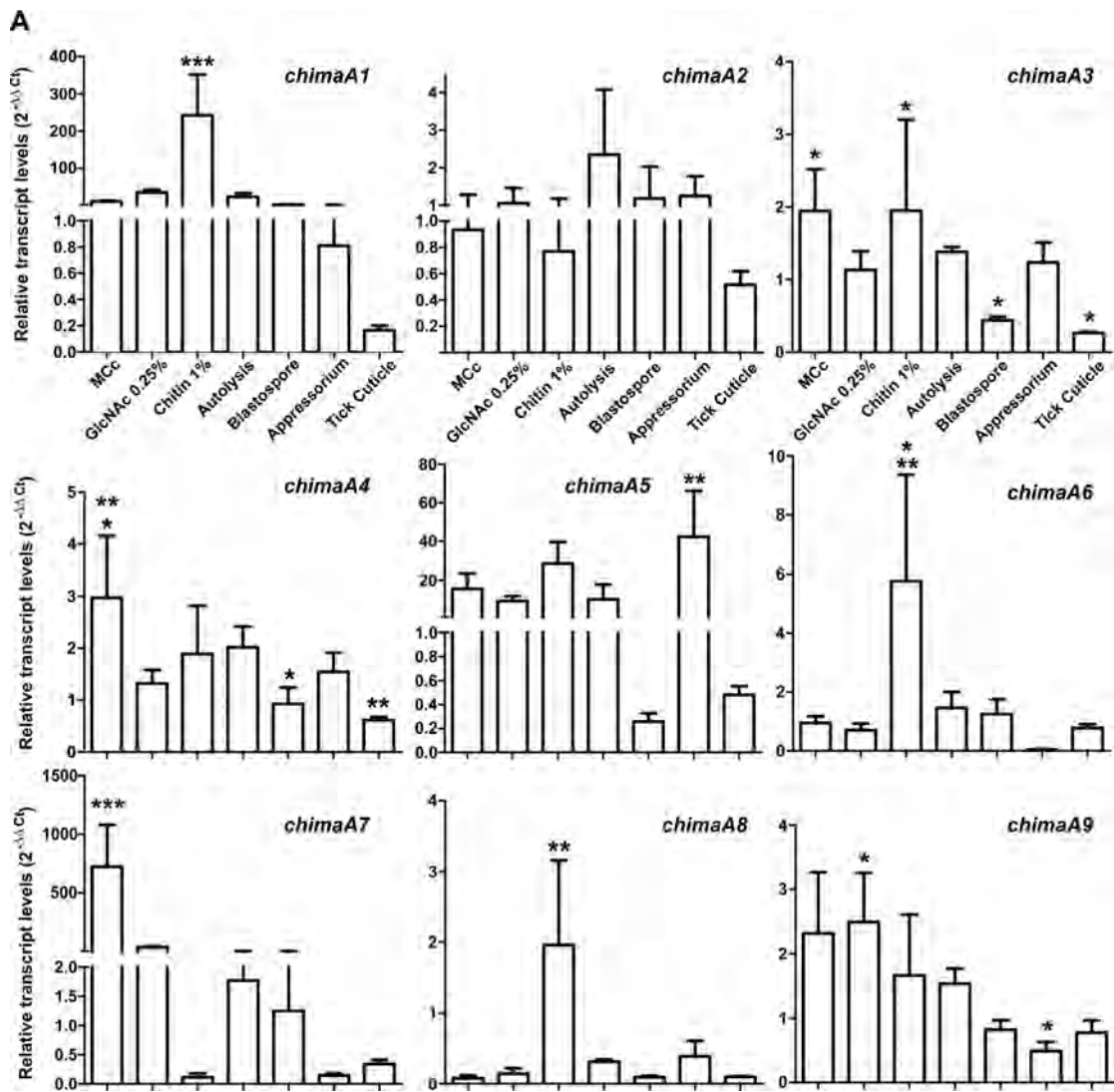
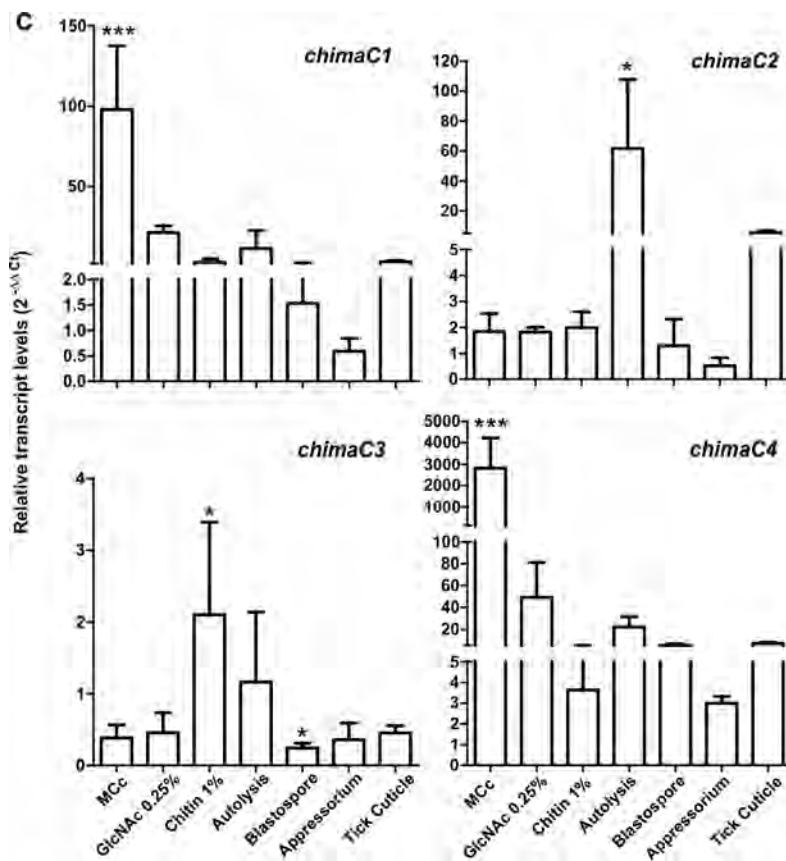
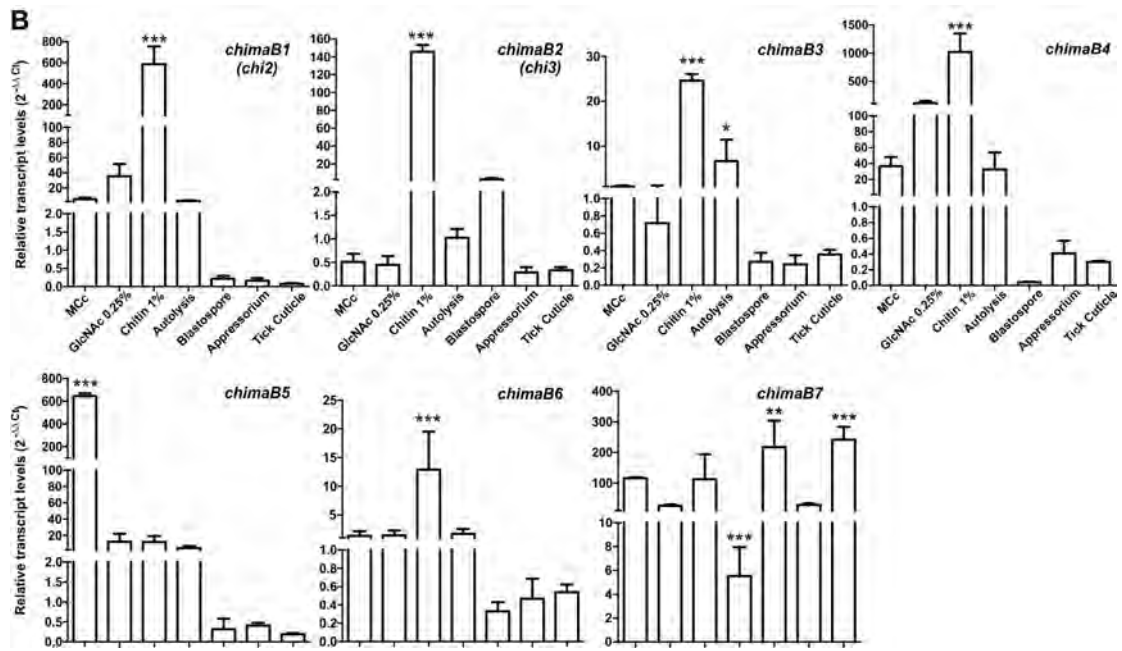


Figure S5: Conservation of intron positions on sgA paralogous chitinases A5 and A7.





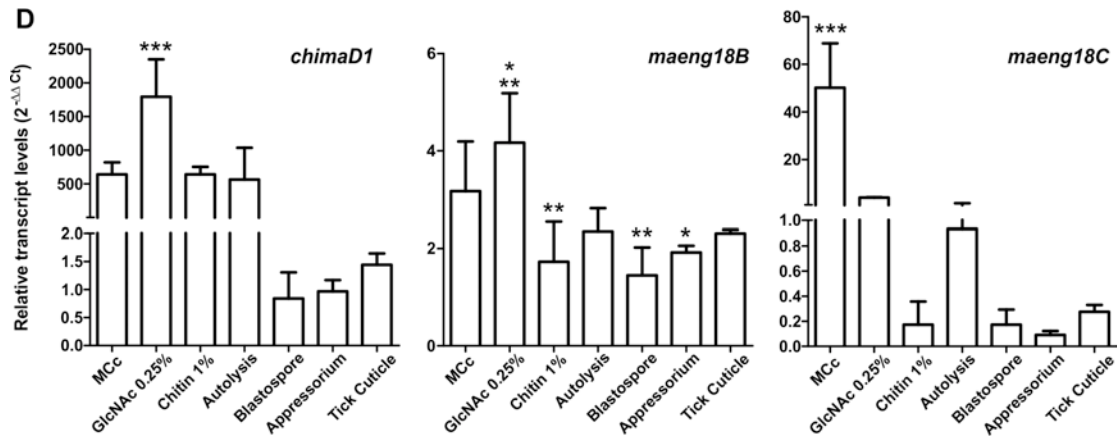


Figure S6 (A-D): Relative transcript levels analysis using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and conidia as the control condition.

S6A to S6D) Relative transcript expression levels of the GH18 genes from subgroups A, B, C, D and E.

Table S1: Chitinase survey of the *M. anisopliae* genome: fungi, number of chitinase sequences and source.

Microorganism	Number of chitinase genes used	Reference or NCBI/BROAD Institute*
<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF23	28	(Gao <i>et al.</i> , 2011), NCBI
<i>M. acridum</i> CQMa102	19	(Gao <i>et al.</i> , 2011), NCBI
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	19	(Zheng <i>et al.</i> , 2011), NCBI
<i>H. jecorina</i> (<i>T. reesei</i>) QM6a	20	(Seidl <i>et al.</i> , 2005), NCBI
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	15	BROAD Institute
<i>A. fumigatus</i> Af293	18	BROAD Institute
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	19	BROAD Institute
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense race 1	25	BROAD Institute
<i>Cryptococcus neoformans</i> var <i>grubii</i> H99	4	BROAD Institute
<i>C. gattii</i> R265	4	BROAD Institute
<i>Histoplasma capsulatum</i> Nam1	10	BROAD Institute
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01 and Pb18	5	BROAD Institute

*Sequences were from the BROAD Institute and NCBI databases.

Table S2: Oligonucleotide sequences used for RT-PCR and qPCR experiments.

Primer name	Forward/Reverse (5'-3')	Efficiency*
ChiMaA1	ATGCCGTCGTTATTTGCTCAGTC/CCACGTCCACCCTCCAATAGA	-
ChiMaA2	AAGGGGACACTCCTGCCATG/CGGCAGTCAGAATATAGCGATCCT	-
ChiMaA3	GAAATTTACCACGAAACGAAGGTCA/CGCTGTTCAACAAGTCATAGGTCA	-
ChiMaA4	ATGAGTAACGACGGGTACCGAAC/TCTTGAAATTGGCACTGTAGGTCC	-
ChiMaA5	ATGCGTTCATGCATGTTTCTG/TCACAGTGACTTGACGCCAGCTTG	-
ChiMaA6	ATGCCGTCTCTTTCGCTTC/CGATGGAGATGAGCAGCTTCA	-
ChiMaA7	ATGACCGCATTGCCCCGTCAACGGC/GTCTCGGCGATTCAATAAATCGTAG	-
ChiMaA8	ATGGCGCCGCTCCTCCACACG/TCAGAGCGGCCCTTGACGTTG	-
ChiMaA9	ATGCGTTTTCGAATCAACACTCTG/TCACTTGGACCCAACTTCTTG	-
ChiMaB1	GGCGGCGGTACGATCGAAAATAAC/ACACATTGGTAAGGGGGAAC	-
ChiMaB2	GCAGCTCCCTCGTGAAGTCCAT/TGTTGCAGTTGCCGTTGTTG	-
ChiMaB3	ATGTCTTCTTCTTTCTGGTCTTTGGC/GTTGCACCACCGAGTGACAAGAC	-
ChiMaB4	ATGACGTTTCCCGTCCAGAC/CCGCCAAGAGAGAGAATGATTG	-
ChiMaB5	ATGGGACAACAGAGCGTGCCTAC/TAGCAAATCTTACCATTTGTC	-
ChiMaB6	ATGCCCTCCTCAGCACCTTC/CTAGCAAGCGCTCGCATCAAC	-
ChiMaB7	ATGTCTTTGTCATTAGGTCTTG/ACAGCTTGGCGTTCTTGCTCT	-
ChiMaC1	TTCGGACGACTTCTGTATTGAATCC/TCAGACCGATTGGCTGCATTTTC	-
ChiMaC2	CTTAATCCATCCACCAAACA/CTCCATCATTATCGTCGTCG	-
ChiMaC3	AAGGAACTTAGAAGTCTGGAATAAGGG/GCTAAGCCACCAATTAAGG	-
ChiMaC4	ATGAAGGCTCTTGTGGCCTTAC/CAGCCAGTTTCGGTTTGATGGATC	-
ChiMaD1	ATGGCGCCGCTCCTCCACAC/TCAGAGCCGCCCTTGACGTTG	-
MaEng18B	ATGCCACCCATACCGCCGCAC/CTATTTCGTGGTCTGTGCCATC	-
MaEng18C	ATGTTTCAGATCATTATATTGCTC/TTATATGCCGCCCCAAGTTG	-
chiA1qPCR	GCGAAGTCGGCGGTCACTAT/GCGTATGCGTCGAGTTTCATCC	1,95
chiA2qPCR	GCGTCGCCCATTGATGTCTCA/ATGTGCCATCATTACGCCACC	1,86
chiA3qPCR	ACGAAGGTCATGGTCGCTGTTG/TCCGCACCAGTCAGGTCAATCA	1,89
chiA4qPCR	GCAACAACGCTTCCACGCCATT/ACCTTCTCCCACGCCCTGAAAG	1,87
chiA5qPCR	CAGGTCCGGGCTCTGTTGAT/TACGTCTTGCGCGTGGTCTC	1,89
chiA6qPCR	GCCGTCTCTTTCGCTTCTTCA/GCTGGAAGTTGGTGCCATTGTG	2,00
chiA7qPCR	CCGACGGCTCCGATACCTATCT/GTAGACCCGTCCAGAACCACT	2,07
chiA8qPCR	ATTACGCTCGCCGTGCTCAC/AATGAACGCTGTGTTGCCTTGC	1,80
chiA9qPCR	ATCAACACTCTGGACAGCACTG/GGGAATCGCAAAGGCAACGT	2,05
chiB1qPCR	CTGGACCTCCTTTATCGCCGAC/ATGATGTGGAGCGCGGGATTT	1,95
chiB2qPCR	GACACAAGCTCACCGTCTA/CCGCCGAGGTTGCCGATACT	1,93
chiB3qPCR	GCGACAAGTTCCTGGCAATTC/GCACCACCGAGTGACAAGACT	1,86
chiB4qPCR	TCGCCAACGCTGGTGATAATTG/CCATTGGTCGCCTGGCAAGA	1,91
chiB5qPCR	GACAACAGAGCGTCGCCTACT/AAGGACCACTACGTCGATGCC	1,87
chiB6qPCR	TCGTGGGCCGGTATAGTAGC/TAGCCAGAATCGCCTTGACAC	2,05
chiB7qPCR	ATACACCACCTCCGTCCACACC/GCAGTCTCCGTGACAGGGCATA	1,86
chiC1qPCR	GCCTACCAGTCTCGCCAAGT/GCAGATTGTTGTCGGAGCCATA	2,03
chiC2qPCR	AGCCAGAGCCGTCAACTATGAG/CGAACCAAGCCTCCTGAACCTT	2,08
chiC3qPCR	TGCGTCTGCGATGACATGCT/GCCAAGAGAACAATGCCTGACC	1,88
chiC4qPCR	AGCCTCGCAGTGTTGTGGAATG/CGAACCAGGAACCTCGGCATAGT	2,06
chiD1qPCR	GTGGTGGCTCAACATGCAGTAC/GCCCTTTATCCAAGCAGTCGGT	2,03
eng18BqPCR	CGCCACTACGACAGCTCATC/TCGAAGCCGCTCAGGTTCTT	1,95
eng18CqPCR	TGGTGGCTGGACAGCTTTCTTC/ACCTCCAAGGTTTCATCCATGCC	1,88
actinqPCR	ACCGTGAGAAGATGACCCAGAT/GAGCAATGGCTGGAGGAAGAG	2,03

*The mean qPCR primer efficiencies were calculated using the LinRegPCR software application.

Table S3: Additional properties of the 24 *M. anisopliae* GH18 proteins.

Identification	ORF length (nt)	Protein length (aa)	Theoretical pI	Mature protein theoretical kDa	N-Glyco
ChiMaA1 (<i>chit1</i>)	1521	423	5.38	44.12 (42)	5
ChiMaA2	1321	359	8.19*	38.60	-
ChiMaA3	1306	397	5.25	42.62	1
ChiMaA4	1301	395	4.91*	44.18	3
ChiMaA5	1309	369	5.60	38.78	2
ChiMaA6	1461	420	8.82	43.49	9
ChiMaA7	1289	371	5.09	39.36	1
ChiMaA8	1209	402	4.53	41.67	5
ChiMaA9	1188	395	6.07	41.20	3
ChiMaB1 (<i>chi2</i>)	1544	419	4.84	41.96 (42)	3
ChiMaB2 (<i>chi3</i>)	1011	317	5.11	32.16 (30 e 32.4)	2
ChiMaB3	1304	329	6.18	32.71	-
ChiMaB4	1442	421	4.95	42.95	1
ChiMaB5	921	306	5.14	33.02	-
ChiMaB6	1023	340	4.82	33.30	2
ChiMaB7	2525	793	7.91	80.63	4
ChiMaC1	4350	1370	5.10	148.23	6
ChiMaC2	4111	1159	6.52*	127.58	-
ChiMaC3	5101	1556	6.64	168.76	7
ChiMaC4	3589	1145	6.10	125.68	3
ChiMaD1	1038	345	5.38	33.81	1
MaEng18A	1071	356	8.34	38.57	3
MaEng18B	1017	338	5.57*	37.58	-
MaEng18C	978	325	5.89	34.33	3

Chitinase and ENGase nucleotide (nt) and amino acid (aa) lengths, molecular mass (kDa), isoelectric point (pI) and predicted post-transcriptional N-glycosylation (Glyco) are indicated. Previously studied chitinases are highlighted in bold. * indicates absence of predicted signal peptide. At mature protein kDa column, the experimentally observed molecular mass is indicated between parentheses.

References

1. Merzendorfer H (2011) The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur J Cell Biol* 90: 759-769.
2. Tharanathan RN, Kittur FS (2003) Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 61-87.
3. Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
4. Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42.
5. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, et al. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233-238.
6. Patil RS, Ghormade VV, Deshpande MV (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26: 473-483.
7. van Munster JM, van der Kaaij RM, Dijkhuizen L, van der Maarel MJ (2012) Biochemical characterization of *Aspergillus niger* CfcI, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. *Microbiology* 158: 2168-2179.
8. Eijsink V, Hoell I, Vaaje-Kolstad G (2010) Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnol Genet Eng Rev* 27: 331-366.
9. Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sorlie M, Eijsink VG (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J* 280: 3028-3049.
10. Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2): 309-316.
11. Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T, et al. (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1063-1070.
12. Ueda M, Kojima M, Yoshikawa T, Mitsuda N, Araki K, et al. (2003) A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *Eur J Biochem* 270: 2513-2520.
13. Honda Y, Taniguchi H, Kitaoka M (2008) A reducing-end-acting chitinase from *Vibrio proteolyticus* belonging to glycoside hydrolase family 19. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 627-634.
14. Geng J, Plenefisch J, Komuniecki PR, Komuniecki R (2002) Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 124: 11-21.
15. Funkhouser JD, Aronson NN, Jr. (2007) Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 7: 96.
16. Gruber S, Seidl-Seiboth V (2012) Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34.
17. Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP (2005) A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* 272: 5923-5939.
18. Karlsson M, Stenlid J (2009) Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16: 208-223.
19. Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, et al. (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7: e1001264.
20. Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu X, et al. (2011) Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol* 12: R116.
21. Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274.
22. Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28: 799-808.
23. Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 533-543.
24. Gruber S, Vaaje-Kolstad G, Matarese F, Lopez-Mondejar R, Kubicek CP, et al. (2011) Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology* 21: 122-133.
25. Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH, et al. (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet* 55: 551-560.
26. Staats CC, Kmetzsch L, Lubeck I, Junges A, Vainstein MH, et al. (2013) *Metarhizium anisopliae*

- chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol* 117: 137-144.
27. Shin KS, Kwon NJ, Kim YH, Park HS, Kwon GS, et al. (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8: 738-746.
 28. Jaques AK, Fukamizo T, Hall D, Barton RC, Escott GM, et al. (2003) Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology* 149: 2931-2939.
 29. Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A (1994) Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10903-10907.
 30. Tzelepis GD, Melin P, Stenlid J, Jensen DF, Karlsson M (2014) Functional analysis of the C-II subgroup killer toxin-like chitinases in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 64: 58-66.
 31. Bogo MR, Rota CA, Pinto H, Jr., Ocampos M, Correa CT, et al. (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* 37: 221-225.
 32. Baratto CM, Dutra V, Boldo JT, Leiria LB, Vainstein MH, et al. (2006) Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Curr Microbiol* 53: 217-221.
 33. da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, et al. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol* 156: 382-392.
 34. Lubeck I, Arruda W, Souza BK, Stanisquaski F, Carlini CR, et al. (2008) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology* 1: 78-88.
 35. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
 36. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382: 769-781.
 37. Zdobnov EM, Apweiler R (2001) InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17: 847-848.
 38. Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, et al. (2012) dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 40: W445-451.
 39. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, et al. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37: D205-210.
 40. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.
 41. Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* 337: 243-253.
 42. Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15: 529-539.
 43. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
 44. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
 45. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
 46. Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 13: 2178-2189.
 47. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37: e45.
 48. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-408.
 49. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, et al. (2006) GenePattern 2.0. *Nat Genet* 38: 500-501.

50. Karlsson M, Stenlid J (2008) Comparative evolutionary histories of the fungal chitinase gene family reveal non-random size expansions and contractions due to adaptive natural selection. *Evol Bioinform Online* 4: 47-60.
51. Stals I, Samyn B, Sergeant K, White T, Hoorelbeke K, et al. (2010) Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *FEMS Microbiol Lett* 303: 9-17.
52. Synstad B, Gaseidnes S, Van Aalten DM, Vriend G, Nielsen JE, et al. (2004) Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur J Biochem* 271: 253-262.
53. Bateman A, Bycroft M (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* 299: 1113-1119.
54. Fuglsang CC, Berka RM, Wahleithner JA, Kauppinen S, Shuster JR, et al. (2000) Biochemical analysis of recombinant fungal mutanases. A new family of alpha1,3-glucanases with novel carbohydrate-binding domains. *J Biol Chem* 275: 2009-2018.
55. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.
56. Hegde RS, Bernstein HD (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* 31: 563-571.
57. Hamaguchi T, Ito T, Inoue Y, Limpaseni T, Pongsawasdi P, et al. (2010) Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology* 20: 420-432.
58. Tzelepis G, Hosomi A, Hossain TJ, Hirayama H, Dubey M, et al. (2014) Endo-beta-N-acetylglucosamidases (ENGases) in the fungus *Trichoderma atroviride*: Possible involvement of the filamentous fungi-specific cytosolic ENGase in the ERAD process. *Biochem Biophys Res Commun* 449: 256-261.
59. Boldo JT, do Amaral KB, Junges A, Pinto PM, Staats CC, et al. (2010) Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 462: 1-7.
60. Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu JR (2014) Correction: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 15: 6.
61. Peterson ME, Chen F, Saven JG, Roos DS, Babbitt PC, et al. (2009) Evolutionary constraints on structural similarity in orthologs and paralogs. *Protein Sci* 18: 1306-1315.
62. Pinto AdS, Barreto CC, Vainstein MH, Schrank A, Ulhoa CJ (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 322-327.
63. Liu ZH, Yang Q, Hu S, Zhang JD, Ma J (2008) Cloning and characterization of a novel chitinase gene (*chi46*) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 241-252.
64. St. Leger RJ, Staples RC, Roberts DW (1993) Entomopathogenic Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* Produce Multiple Extracellular Chitinase Isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 81-84.
65. Kruszewska JS, Perlinska-Lenart U, Gorka-Niec W, Orłowski J, Zembek P, et al. (2008) Alterations in protein secretion caused by metabolic engineering of glycosylation pathways in fungi. *Acta Biochim Pol* 55: 447-456.
66. Barreto CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol* 48: 102-107.
67. Santi L, Silva WO, Pinto AF, Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biol* 114: 312-319.
68. Santi L, Silva WO, Pinto AF, Schrank A, Vainstein MH (2009) Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Res Microbiol* 160: 824-828.
69. Nielsen CB, Friedman B, Birren B, Burge CB, Galagan JE (2004) Patterns of intron gain and loss in fungi. *PLoS Biol* 2: e422.
70. Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* 45: 963-972.
71. Alcazar-Fuoli L, Clavaud C, Lamarre C, Aïmanianda V, Seidl-Seiboth V, et al. (2011) Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 48:

- 418-429.
72. Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39: 121-152.
 73. Fan Y, Zhang Y, Yang X, Pei X, Guo S, et al. (2007) Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 56: 93-99.
 74. Kong LA, Yang J, Li GT, Qi LL, Zhang YJ, et al. (2012) Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog* 8: e1002526.
 75. Deising HB, Werner S, Wernitz M (2000) The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* 2: 1631-1641.

Capítulo 2 – Construção de mutantes nulos para as quitinases do subgrupo C em *Metarhizium anisopliae*.

Resultados preliminares da construção vetores para geração de mutantes nulos para análise funcional dos genes que compõe o subgrupo C.

2.1 Introdução

Os fungos filamentosos apresentam um sistema quitinolítico composto de diversas enzimas responsáveis pela degradação de quitina. O genoma do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* linhagem E6 exibe 24 genes que codificam para quitinases e ENGases, enzimas pertencentes às glicosil hidrolases da família 18 (GH18). A parede celular de fungos assim como o exoesqueleto de artrópodes é composto por microfibrilas de quitina e a ação dessas enzimas sobre substratos quitinolíticos resulta na liberação de quitooligossacarídeos. As funções atribuídas a essas enzimas envolvem processos como: o remodelamento da parede celular, a nutrição via degradação de quitina exógena e a invasão de hospedeiros pela dissolução da cutícula de hospedeiros artrópodes [Seidl, 2008; Hartl *et al.*, 2012].

A primeira classificação de quitinases em subgrupos foi realizada por Seidl *et al.* [2005] em *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*), dividindo essas enzimas em três subgrupos A, B e C. Karlsson & Stenlid [2009] também classificaram as quitinases da família GH18 incluindo em sua análise proteínas pertencentes a fungos, plantas, bactérias e vírus. Posteriormente, a análise dos genes da família GH18 em *M. anisopliae* realizada pelo grupo propôs dois novos subgrupos, D e E [Junges *et al.*, 2014 Capítulo 1].

As quitinases do subgrupo C são proteínas GH18 encontradas unicamente em fungos, e que apresentam elevada massa molecular comparativamente às outras quitinases (> 120 kDa). Além do domínio GH18 característico, essas proteínas também exibem múltiplos módulos de ligação a carboidratos (CBM - *Carbohydrate-binding modules*) [Seidl *et al.*, 2005, Seidl, 2008]. Dois tipos de CBMs são frequentemente encontrados em quitinases fúngicas deste subgrupo, CBM18 e CBM50, ambos possivelmente envolvidos na ligação ao substrato quitinoso [Boraston *et al.*, 2004].

M. anisopliae apresenta quatro quitinases do sgC, nomeadas como ChiMaC1, ChiMaC2, ChiMaC3 e ChiMaC4 [Junges *et al.*, 2014 Capítulo 1]; exibindo um número menor de genes nesse subgrupo do que o número apresentado por *M. robertsii* (8 genes) ou *C. militaris* (5 genes), e maior do que o apresentado por *M. acridum* (3 genes) [Gao *et al.*, 2011]. Os transcritos dos genes *chimaC1* e *chimaC4* foram induzidos durante o crescimento em meio rico e os transcritos de *chimaC2* e *chimaC3* foram induzidos em condições autolíticas e em cultivos contendo quitina 1 % como única fonte de carbono,

respectivamente [Junges *et al.*, 2014 Capítulo 1]. De maneira geral, os transcritos das quitinases do sgC apresentaram os menores níveis de expressão quando comparados aos níveis de transcritos das quitinases dos outros subgrupos [Junges *et al.*, 2014 Capítulo 1).

As quitinases do subgrupo C foram estudadas com maior detalhe no fungo micoparasita *T. atroviride* e em *A. nidulans* [Gruber *et al.*, 2011; Tzelepis *et al.*, 2014]. O número de genes do sgC no gênero *Trichoderma* é maior do que o encontrado em outros genomas fúngicos, de maneira que *T. atroviride* apresenta nove genes do sgC e *T. virens* possui 15 genes. O menor número de genes de quitinase do sgC em *M. anisopliae* indica que provavelmente não houve uma expansão deste subgrupo como àquela observada para os gêneros *Trichoderma*, *Gibberella* e *Uncinocarpus* [Seidl, 2008]. Por outro lado, a presença de dois potenciais pseudogenes de quitinases do sgC em *M. anisopliae* sugere que uma expansão de genes desse subgrupo não foi importante para o fungo [Junges *et al.*, 2014, Capítulo 1].

Sobre as contrações e expansões em famílias gênicas, Wapinski *et al.* [2007] sugere que genes relacionados ao desenvolvimento apresentam seleção contra a mudança no número de cópias enquanto genes relacionados ao estresse frequentemente são expostos a duplicações e perdas. O elevado número de cópias de genes que estariam relacionados ao estresse pode ser benéfico ao organismos de maneira a permitir adaptações a diferentes nichos ecológicos. Os eventos de possíveis perdas de genes do sgC em *M. anisopliae*, por apresentar duas cópias não-funcionais (pseudogenes) além da ausência de dois ortólogos que estão presentes em *M. robertsii*, acrescenta relevância no estudo dos genes que compõem esse subgrupo.

As quatro quitinases do sgC de *M. anisopliae* ainda não foram estudadas e representantes desse subgrupo não foram estudados em nenhum fungo entomopatogênico. Com o objetivo de realizar a análise funcional dos genes do subgrupo C, foram construídos quatro vetores contendo *cassettes* para a deleção de cada gene isoladamente. *M. anisopliae* foi co-cultivado com *Agrobacterium tumefaciens* contendo os vetores de interesse (pPZP:: Δ C1, pPZP:: Δ C3 e pPZP:: Δ C4) conforme protocolo de agrotransformação previamente estabelecido [Staats *et al.*, 2007]. Colônias fúngicas capazes de se desenvolver em meio contendo glifosinato de amônio foram isoladas e transformantes para cada uma das quatro construções foram recuperados para posterior análise.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material Biológico

A linhagem *M. anisopliae* E6 utilizada neste trabalho foi originalmente isolada de *Deois flavopicta* (Hemiptera:Cercopidae) no estado do Espírito Santo, Brasil, cedida pelo Prof. João Lúcio de Azevedo da coleção da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). A linhagem e o vetor binário de *A. tumefaciens* utilizados em nosso protocolo de agrotransformação são EHA105 e pPZP201BK, respectivamente. As células EHA105 foram preparadas para quimiocompetência.

2.2.2 Meios de Cultivo e Manutenção dos Organismos

Meios de Cultivo e Manipulação para M. anisopliae

Os meios de cultivo utilizados para a manutenção e repiques de *M. anisopliae* foram: Meio de Cove (MC) [glicose 1 %, NaNO₃ 0,6 %, pH 7,0] e Meio de Cove Completo (MCc) [glicose 1 %, NaNO₃ 0,6 %, casaminoácidos 0,15 %, extrato de levedura 0,05 %, peptona 0,2 %, pH 7,0]. São ainda acrescidos: 2 % (v/v) de Solução de Sais [KCl 2,6 %, MgSO₄•7H₂O 2,6 % e KH₂PO₄ 7,6 % (p/v)] e 0,04 % (v/v) de Solução de Elementos Traços [Na₂Ba₄O₇•7H₂O 4 mg %, CuSO₄•5H₂O 40 mg %, FeSO₄ 1 mg %, Na₂MNO₄•7H₂O 80 mg %, MnSO₄•7H₂O 80 mg % e ZnSO₄•7H₂O 80 mg % (p/v)]. Para meios sólidos foi acrescido 1,5 % de ágar. As suspensões de esporos do fungo foram efetuadas utilizando-se 3 mL de Tween 80 % estéril para cada placa de Petri contendo *M. anisopliae* esporulado em MCc; centrifugações e lavagens com água destilada estéril; ressuspensão dos esporos em 1 mL e contagem da diluição dos mesmos em Camara de Neubauer.

Meios de Cultivo e Manipulação para E. coli

Inóculos de células de *E. coli* XL1-Blue ou TG2 foram efetuados em Meio Luria-Bertani (LB) [triptona 1 %, extrato de levedura 5 %, NaCl 1 % (p/v), pH 7,0] e em Meio SOC [triptona 1 %, extrato de levedura 5 %, NaCl 1 % e glicose 20 mM] após

eletroporação. Aos meios sólidos foram adicionados 1,5 % de ágar. Todos foram mantidos a 37°C.

2.2.3 Construção de cassetes para deleção de quitinases do *sgC*

Para a construção dos *cassetes* de deleção dos genes de quitinases foram selecionadas regiões contendo 1.000 pb, localizadas nas regiões que flanqueiam as sequências codificantes para cada gene. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar as regiões flanqueadoras assim como para o *cassette* que expressa o gene *bar*. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela B. Este gene codifica uma fosfinotricina acetiltransferase [Thompson *et al.*, 1987] que confere resistência ao antibiótico glifosinato de amônio e permite, portanto, a seleção de transformantes de *M. anisopliae* em meio contendo este antibiótico (250 µg/mL) (Figura F). A partir de uma PCR de sobreposição estes três fragmentos são fusionados [Yu *et al.*, 2004]. O fragmento fusionado foi primeiramente clonado em pCR2.1-TOPO, propagado e após subclonado em pPZP201BK. As clonagens foram confirmadas por clivagens com enzimas de restrição e PCR. Os vetores confirmados pPZP::ΔC1, C2, C3 e C4 foram transformados em *A. tumefaciens* EHA105.

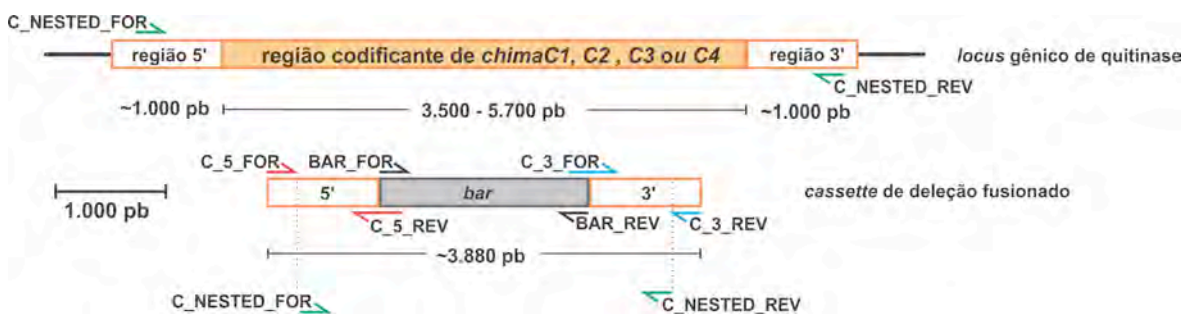


Figura F. Representação esquemática da construção dos cassetes para deleção dos genes de quitinases do *sgC* em *M. anisopliae*. As regiões 5' e 3' de cada gene de quitinase do *sgC* (em laranja), contendo 1.000 pb, foram amplificadas com pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene (destacados em vermelho e em azul). O *cassette* para expressão do gene que confere resistência a glifosinato de amônio (*bar*, em cinza), foi amplificado com par de oligonucleotídeos BAR_FOR e BAR_REV (preto) e fusionado às regiões 5' e 3' por PCR de fusão. As setas indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para construção e confirmação do *cassette*.

Tabela B: Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores de deleção dos genes de quitinase do sgC.

Identificação	Sequência 5' - 3'	Objetivo
C1_5_FOR	GTATGGAACCGGCGGCTTAAT	Amplifica a região 5' do gene C1
C1_5_REV	<u>TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCACTGTACAGTTTGT</u> GAGAGCGAAGAGTCT	
C1_3_FOR	<u>TGTACTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTGGGGCC</u> CACCTGGTCCTC	Amplifica a região 3' do gene C1
C1_3_REV	CTAAACAGATGAACTGCTTC	Amplifica o <i>cassette</i> de deleção
C1_NESTED_FOR	AGAGCGTGATAGACTCGAAT	
C1_NESTED_REV	ATGCGTAACGGACGATGCCA	Amplifica a região 5' do gene C2
C2_5_FOR	GCTGATTAGTACCGCCAGCC	
C2_5_REV	<u>TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCACTGTACAGTGTTT</u> GGTGGATGGATTAAG	Amplifica a região 3' do gene C2
C2_3_FOR	<u>TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTGCTCAA</u> CAGATCTTTTTTC	
C2_3_REV	GCGCCAACGCTTCCCTCTGG	Amplifica o <i>cassette</i> de deleção
C2_NESTED_FOR	GAACCCATCATTAACCCG	
C2_NESTED_REV	ATCAACCGCAACCCGGATT	Amplifica a região 5' do gene C3
C3_5_FOR	CAGGCCACGCATACTGTCTGG	
C3_5_REV	<u>TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCACTGTACAGCTTGA</u> CTAGTTGCAGGATGA	Amplifica a região 3' do gene C3
C3_3_FOR	<u>TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTGAAGTA</u> CAGTATCTTGCGGG	
C3_3_REV	GCGCAACATGGCAAGCGATG	Amplifica o <i>cassette</i> de deleção
C3_NESTED_FOR	GGTTCCCTTGACAAGGTTT	
C3_NESTED_REV	GAGAACTTGGTGGAGGCC	Amplifica a região 5' do gene C4
C4_5_FOR	AGCGCACTCACCATTCAGTA	
C4_5_REV	<u>TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCCATGTACAGGGTTC</u> GTATTGCCCGAAGGA	Amplifica a região 3' do gene C4
C4_3_FOR	<u>TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTGGTAA</u> GCAGGAAGTGTAG	
C4_3_REV	ACGGTGCGTCCGTCGTAATCC	Amplifica <i>cassette</i> de deleção
C4_NESTED_FOR	CGTTCCAGCCGGCAACGGTG	
C4_NESTED_REV	CTACACCACTGGCCTGGATG	Amplifica o <i>cassette</i> de expressão da marca de seleção (gene <i>bar</i>)
BAR_FOR_1880	CTGTACAGTGACCGGTGACT	
BAR_REV_1880	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG	Confirma a presença do gene C1
C1F1	TCTCAAGGCTGTCCGCTCCAA	
C1R1(96)	GGCATCGTCGCTGTCAACACT	Confirma a presença do gene C2
C2F1 (145)	ACGGCATCACAAACGGACGAATT	
C2R1	CCACACGCTACGCCATCTACTG	Confirma a presença do gene C3
C3F1(174)	CAGCCGAGTCCACTCTGAATGC	
C3R1	TCCACGCCAACACCGCTCTT	Confirma a presença do gene C4
C4F1 (180)	GATCATTGAGCCGCCACAGAGT	
C4R1	TGGTCTGCTGGAGTGTCTGGAT	

A sequência sublinhada indica a região de sobreposição entre o *cassette* de resistência (gene *bar*) e as regiões 5'e 3' do gene a ser deletado.

2.2.4 Transformação de *M. anisopliae* mediada por *A. tumefaciens* (ATMT)

As células de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores pPZP:: Δ C1, pPZP:: Δ C3 e pPZP:: Δ C4 foram utilizadas para agrotransformação de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido [Staats *et al.*, 2007]. Brevemente, células de *A. tumefaciens* portando o vetor recombinante foram co-cultivadas com esporos *M. anisopliae* para permitir a transferência do material inserido entre as bordas esquerda e direita do vetor. É utilizada acetoseringona para permitir a indução dos genes de virulência da bactéria. Foram feitas 30 placas para cada agrotransformação e, a partir dessas placas, as colônias fúngicas transformantes que foram capazes de atravessar a camada de top ágar contendo glifosinato de amônio foram recuperadas e isoladas. As linhagens transformantes se caracterizam pela inserção: do *cassette* de deleção das quitinases e do *cassette* de expressão do gene de resistência a glifosinato amônio.

2.2.5 Busca por mutantes nulos dentre as colônias transformantes

Para confirmar a inserção dos *cassettes* nos transformantes gerados, foi realizada extração de DNA de esporos em micro-ondas seguido de PCR [modificada de Ferreira & Glass, 1996]. Uma alçada de esporos foi retirada de placas esporuladas de *M. anisopliae* e adicionada em tubos Eppendorf. Após permanecer por 10 minutos no micro-ondas em potência máxima, foram adicionados 30 μ l de tampão TE (Tris-Cl 1mM pH8,0, EDTA 10mM) à amostra e os tubos foram homogeneizados. Em seguida, após centrifugação (10 minutos, 18.400 g), 20 μ l do sobrenadante foram diluídos pela adição de 180 μ l de água milliQ e 1 μ l deste material foi utilizado como molde na reação de PCR.

A reação de PCR realizada amplifica uma parte da região codificante do gene de interesse contendo ~200 pb e contida somente no *locus* selvagem, portanto, um resultado negativo é esperado para os possíveis transformantes positivos. Essa reação foi repetida três vezes para confirmar a ausência de produtos de amplificação. Posteriormente, as colônias transformantes que apresentarem resultado negativo são inoculadas em meio líquido para cultivo de micélio fúngico e extração de DNA. Em uma segunda análise por PCR, o oligonucleotídeo senso anela no *locus* genômico do gene estudado e o

oligonucleotídeo antisense anela em uma região presente exclusivamente no *cassette* de deleção construído. Os oligonucleotídeos utilizados nessas reações estão listados na Tabela B. Os produtos de amplificação resultantes fornecem informação a respeito da inserção homóloga ou ectópica dos *cassettes* construídos.

2.3 Resultados:

2.3.1 Confirmação da construção de vetores para promover a deleção de genes do *sgC*:

Utilizando uma reação de fusão por PCR, regiões 5' e 3' de cada um dos quatro genes de quitinase ChiMaC1, ChiMaC2, ChiMaC3 e ChiMaC4 de *M. anisopliae* foram fusionadas ao *cassette* de expressão da marca de resistência. As quatro diferentes fusões foram clonadas no vetor pCR2.1TOPO dando origem aos plasmídeos pCR21:: Δ C1, pCR21:: Δ C2, pCR21:: Δ C3 e pCR21:: Δ C4. Após confirmações, os quatro os *cassettes* de deleção para os genes de quitinase foram clonados em pPZP201BK para obtenção dos vetores de agrotransformação pPZP:: Δ C1, pPZP:: Δ C2, pPZP:: Δ C3 e pPZP:: Δ C4. As construções foram confirmadas por digestão com enzimas de restrição e reações de PCR (Figuras G e H).

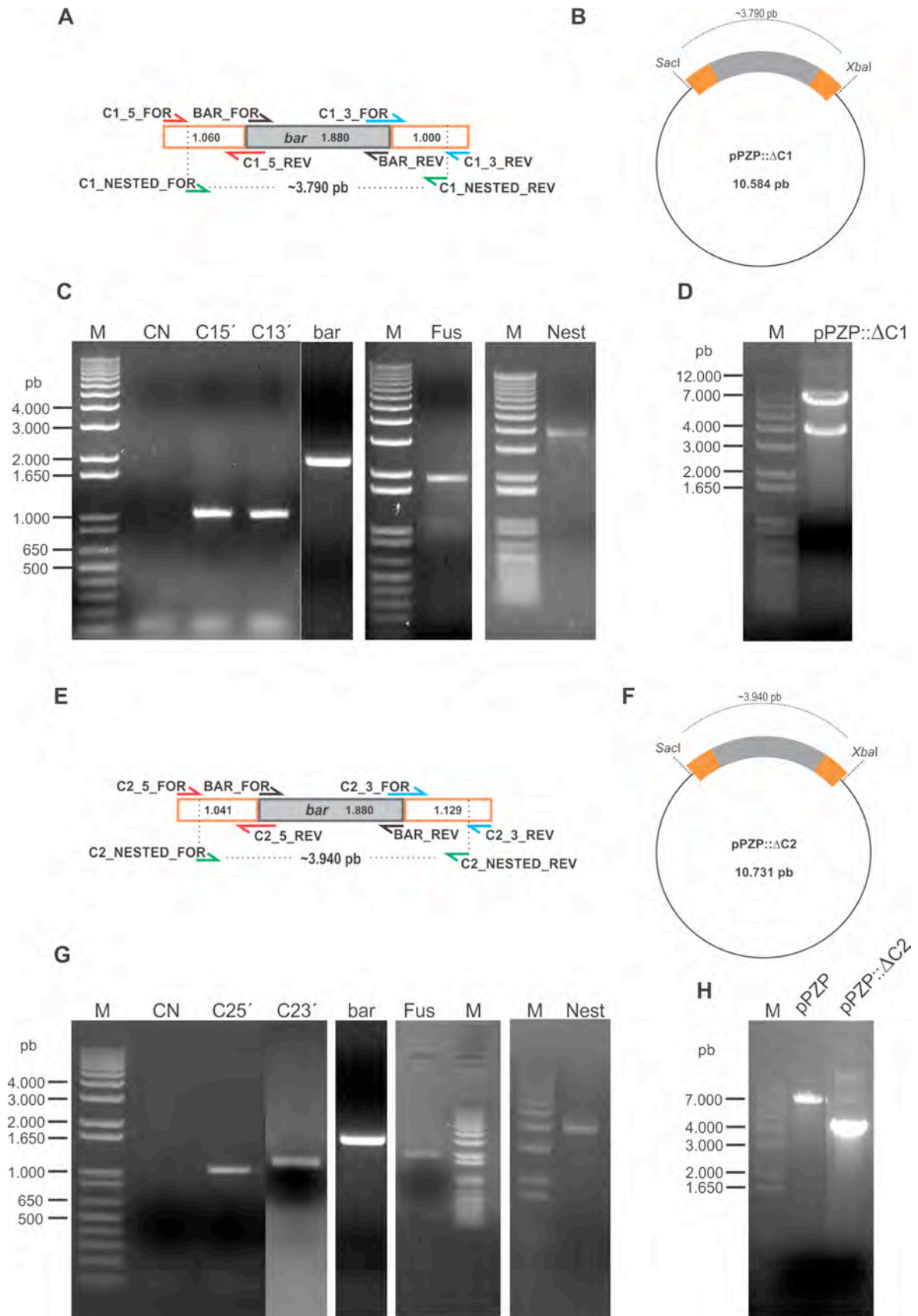


Figura G. Confirmação da construção dos vetores pPZP:: Δ C1 e pPZP:: Δ C2. Representação esquemática dos *cassettes* de deleção de ChiMaC1 (A e B) e de ChiMaC2 (E e F): as regiões 5' e 3' de cada gene estão fusionadas com o *cassette* para expressão do gene que confere resistência a glifosinato de amônio (indicado como *bar*). Confirmação da construção dos *cassettes* de deleção por reações de PCR (C e G) e dos respectivos vetores por digestão com enzimas de restrição (D e H). As setas indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados e as enzimas de restrição destacadas foram utilizadas para confirmação da construção dos vetores. A digestão dos vetores pPZP:: Δ C1 e pPZP:: Δ C2 foi realizada com as enzimas de restrição *XbaI* e *SacI* (D e H, respectivamente). pPZP201BK (6.794 pb). M- marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder, CN- controle negativo, C15 – região 5' de ChiMaC1, C13 – região 3' de ChiMaC1, C25' - região 5' de ChiMaC2, C23' - região 3' de ChiMaC2, Fus – reação de fusão entre as regiões 5', 3' e a marca de resistência, Nest – reação de amplificação do *cassette* fusionado.

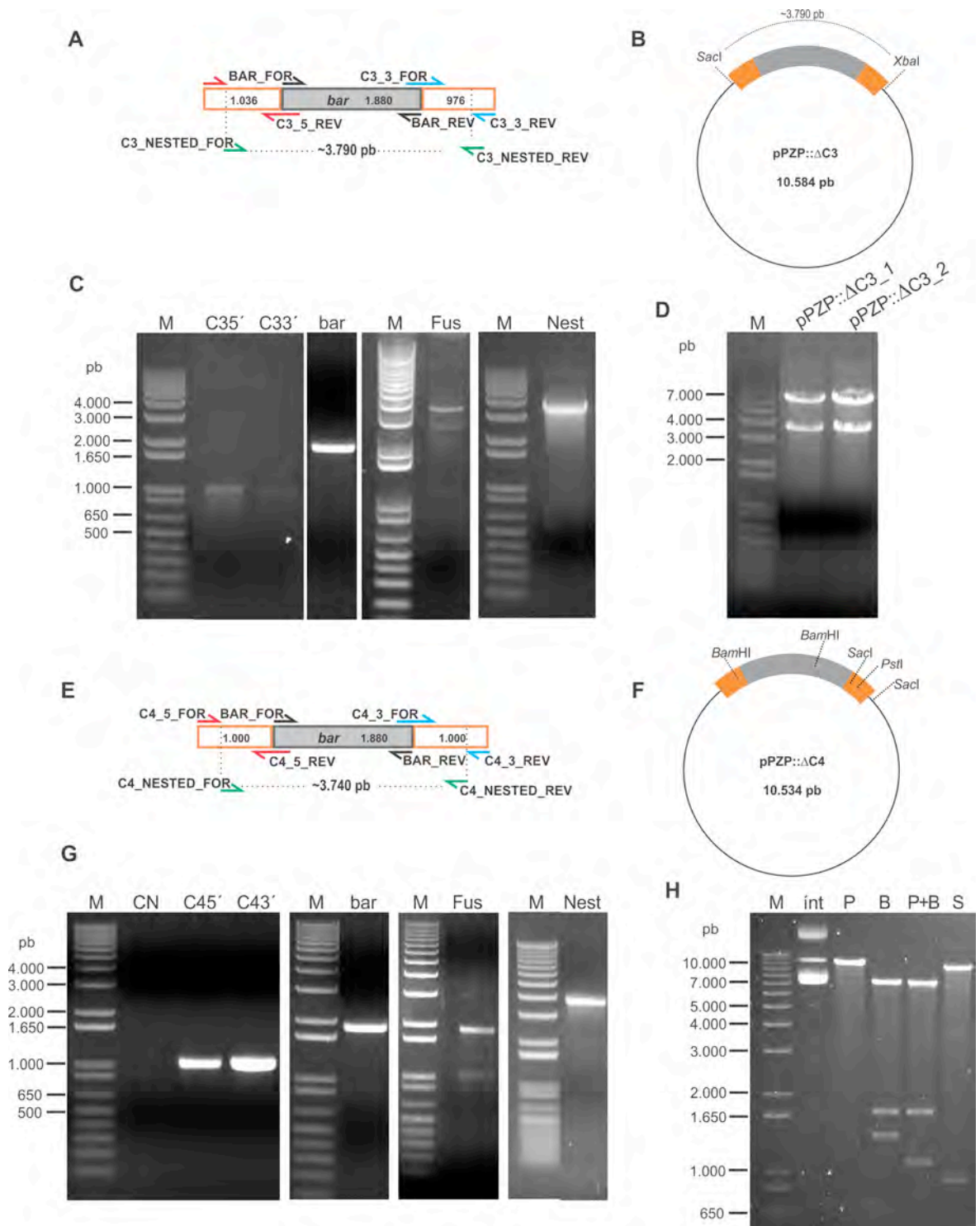


Figura H. Confirmação da construção dos vetores pPZP:: Δ C3 e pPZP:: Δ C4. Representação esquemática dos *cassettes* de deleção de ChiMaC3 (indicado em A e B) e de ChiMaC4 (E e F): as regiões 5' e 3' de cada gene estão fusionadas com o *cassette* para expressão do gene que confere resistência a glifosinato de amônio (indicado como *bar*). Confirmação da construção dos *cassettes* de deleção por reações de PCR (indicado em C e G) e dos vetores por digestão com enzimas de restrição (D e H). As setas indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados e as enzimas de restrição destacadas foram utilizadas para confirmação da construção dos vetores. A digestão dos vetores pPZP:: Δ C3 e pPZP:: Δ C4 foi realizada com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sac*I (indicado em D) e *Pst*I, *Bam*HI e *Sac*I (H). pPZP201BK (6.794 pb). M- marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder, CN- controle negativo, C35' – região 5' de ChiMaC3, C33' – região 3' de ChiMaC3, C45' - região 5' de ChiMaC4, C43' - região 3' de ChiMaC4, Fus – reação de fusão entre as regiões 5', 3' e a marca de resistência, Nest – reação de amplificação do *cassette* fusionado.

2.3.2. ATMT de *M. anisopliae*:

Seguindo protocolo previamente estabelecido, aproximadamente 300 colônias fúngicas foram recuperadas a partir de cada experimento de agrotransformação. O número de transformantes recuperados foi de 333 para $\Delta C1$, 200 para $\Delta C3$ e 275 para $\Delta C4$. Não foi realizado experimento de agrotransformação para $\Delta C2$. As colônias se desenvolveram em meio mínimo contendo glifosinato de amônia (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e foram mantidas nesta mesma condição por repiques sucessivos.

Como pode ser observado na Figura I, a maior parte das colônias recuperadas apresentaram desenvolvimento micelial e produção de esporos esverdeados, assim como normalmente observado para o tipo selvagem. Algumas das colônias recuperadas exibiram desenvolvimento micelial reduzido e uma delas apresentou a coloração dos esporos levemente avermelhada.

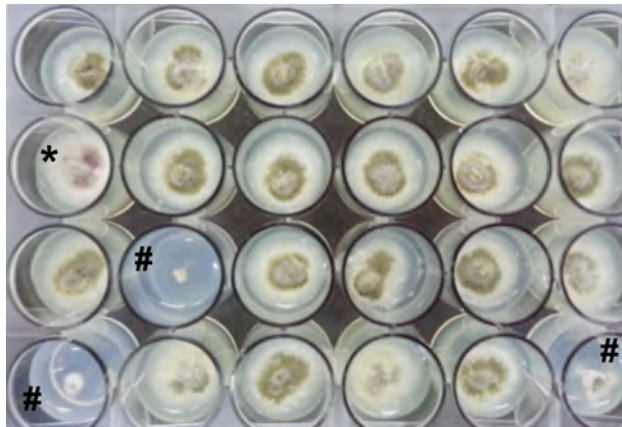


Figura I. Aspecto fenotípico de algumas colônias de transformantes $\Delta C3$ obtidos nos eventos de agrotransformação. Desenvolvimento diferencial de colônias fúngicas entre transformantes isolados do experimento de agrotransformação exibindo desenvolvimento micelial (branco) e produção de esporos (esverdeados). * - aparente coloração avermelhada dos esporos, # - colônias transformantes com desenvolvimento reduzido.

2.3.3. Busca por mutantes nulos nas colônias transformantes

Para detectar quais, dentre os 200 - 300 transformantes recuperados de cada ATMT, são mutantes nulos (oriundos de eventos de recombinação homóloga), foi efetuada uma primeira etapa de seleção. Essa primeira etapa consistiu de reações de PCR consecutivas. O material utilizado como molde de DNA dos transformantes foi obtido pela extração de DNA dos esporos em micro-ondas. Na Figura J pode-se observar exemplos dos produtos de amplificação obtidos utilizando-se essa metodologia. Como nessa primeira reação de PCR o resultado esperado é negativo, somente os transformantes que não produziram produtos de PCR foram selecionados para a próxima etapa. Das 333 colônias transformantes obtidas para $\Delta C1$, 16 exibiram o padrão negativo esperado. A ausência de produtos de amplificação também foi observada para 16 dos 200 transformantes $\Delta C3$ e apenas dois transformantes $\Delta C4$ apresentaram o padrão negativo após reações (Tabela C). O padrão negativo foi repetido três vezes utilizando como molde DNA de uma extração independente a cada vez.

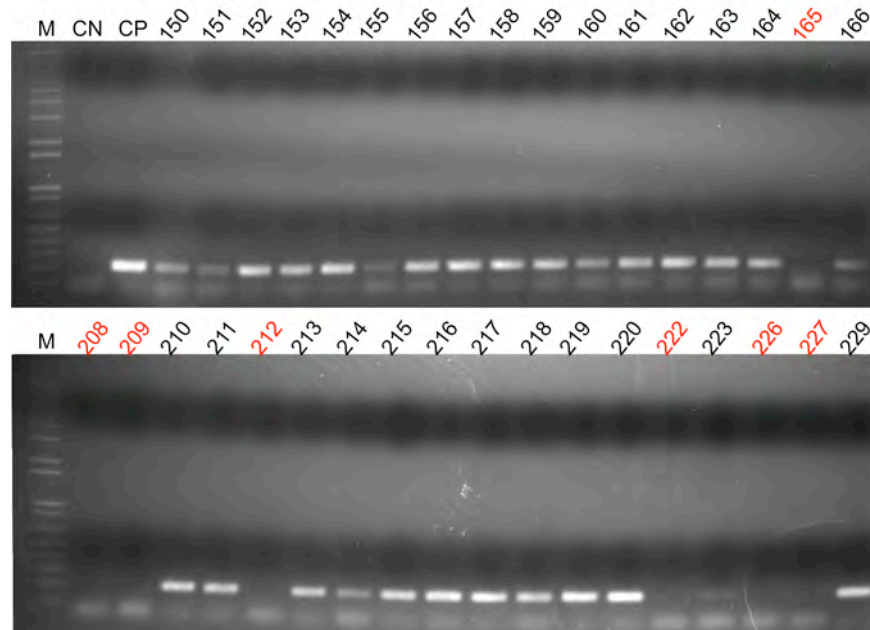


Figura J: Primeira etapa da detecção de mutantes para os genes *chimaC1*, *C3* e *C4*. Utilizando reações de PCR, todos os transformantes de cada agrotransformação foram analisados para encontrar mutantes nulos. Produtos de amplificação esperados possuem ~200 pb.

Considerando apenas essa primeira etapa de busca, o número de transformantes que apresentaram o padrão esperado para um mutante nulo na reação de PCR foi reduzido.

Tabela C: Número de potenciais transformantes mutantes nulos dentre os transformantes $\Delta C1$, $\Delta C3$ e $\Delta C4$.

Construção	No. de mutantes nulos	No. de transformantes obtidos no experimento ATMT	Frequência (%)
$\Delta C1$	16	333	4,8
$\Delta C3$	16	200	8
$\Delta C4$	2	275	0,7

2.4 Discussão

Dentre as estratégias de transformação de fungos utilizadas, a transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) tem sido a mais bem sucedidas em diferentes modelos de fungos filamentosos e em espécies do gênero *Metarhizium*. O protocolo de ATMT desenvolvido por Staats *et al.* [2007] foi utilizado para transformar *M. anisopliae* com vetores de deleção para genes das quitinases ChiMaB1 e ChiMaB2 [Boldo *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2013]. Alguns trabalhos em andamento em nosso grupo também mostraram efetividade no isolamento de transformantes por ATMT de *M. anisopliae*. Além disso, diversos estudos em outras espécies de *Metarhizium* utilizaram ATMT com sucesso, como por exemplo em *M. robertsii* [Donzelli *et al.*, 2012], *M. anisopliae* ARSEF2575 [Moon *et al.*, 2008], *M. anisopliae* BCRC35505 [Tseng *et al.*, 2011] e *M. brunneum* [Sevim *et al.*, 2012].

A frequência de recombinação homóloga é um dos fatores mais importantes para a geração de mutantes nulos. O evento de ATMT é bem sucedido independente da inserção do *cassette* de deleção no *locus* selvagem ou em locais ectópicos do genoma do fungo. No entanto, a inserção no *locus* selvagem, resultado da recombinação homóloga do *cassette* de deleção, é o objetivo principal da construção de mutantes nulos e nem sempre a frequência desse evento é elevada. Por esse motivo, a construção de mutantes nulos para um dos genes responsáveis pela via de recombinação não-homóloga em fungos (Ku70, Ku80, entre outros), é utilizada para induzir o sistema a utilizar via alternativa e consequentemente

aumentar a frequência de recombinação homóloga [Carvalho *et al.*, 2010]. Nenhuma linhagem mutante para os genes Ku foi construída até então para espécies de *Metarhizium*.

O baixo número de mutantes potenciais oriundos de um evento de recombinação homóloga obtidos nas agrotransformações para $\Delta C1$, $\Delta C3$ e $\Delta C4$ poderá ser melhorado ao se utilizar uma linhagem $\Delta Ku70$. Contudo mesmo com uma baixa frequência de recombinação homóloga, o número de mutantes nulos para os genes construídos poderia ter sido relativamente maior. Um dos motivos para que essa frequência tenha sido baixa em nossos experimentos pode ser uma provável alteração no desenvolvimento fúngico causado pelas deleções de algumas das quitinases. Essa hipótese deve-se ao fato de que no momento de retirar as colônias transformantes das placas de ATMT é possível que os mutantes nulos apresentem desenvolvimento retardado em relação as colônias transformantes com inserção ectópica e sejam, dessa maneira, preteridos na sua recuperação e repique para novo meio seletivo.

3. Discussão Geral

Fungos da ordem Hypocreales participam de associações simbióticas com diversos animais, plantas e outros fungos, apresentando tanto interações mutualistas quanto antagonistas. A evidência fóssil mais antiga de parasitismo animal por fungos foi descrita e localizada temporalmente no período Cretáceo, em torno de 100 milhões de anos atrás: um inseto hemíptero fossilizado em âmbar e parasitado pelo fungo *Paleoophiocordyceps coccophagus* (ordem Hypocreales, família Ophiocordycipitacea) [Sung *et al.*, 2008]. Com base nessa evidência fóssil, a relação de simbiose fungo-animal mais ancestral nos fungos da ordem Hypocreales foi estimada ter ocorrido entre 173 e 158 milhões de anos.

A família das quitinases também é considerada ancestral [Funkhouser & Aronson, 2007] e, em fungos foram descritas contrações e expansões no número de genes que compõem essa família [Karlsson & Stenlid, 2009]. Como resultado desses eventos, há grande variabilidade nesse conteúdo gênico entre fungos, destacando-se a diferença entre a presença de um único gene em *S. pombe* e 36 genes em *T. virens*. Pelo menos duas contrações na família GH18 foram detectadas nos fungos *S. pombe* e *C. immitis* e seis expansões foram detectadas em *T. reesei*, *A. nidulans*, *U. reesii*, *G. zaeae* e *R. oryzae*. O desenvolvimento unicelular está correlacionado com a redução do número de cópias gênicas de quitinases, o que enfatiza a ação combinada de muitas quitinases para o desenvolvimento filamentosos [Karlsson & Stenlid, 2009].

A expansão que ocorreu no número de genes que compõem essa família em fungos pode estar diretamente correlacionado com a importância dessa classe de enzimas para o estilo de vida entomopatogênico. Pelo menos para as duas quitinases ChiMaB1 e ChiMaB2 pode-se conjecturar que a sua participação para a patogenicidade de *M. anisopliae* é importante, pois os mutantes para tais genes exibiram comprovada diminuição na virulência desse entomopatógeno sobre *D. peruvianus* [Boldo *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2013]. A presença da quitina na carapaça dos artrópodes, os quais abrangem entre 4-6 milhões de espécies [Novotny *et al.*, 2002], pode ter relação com essa expansão do número de quitinases em entomopatógenos. A diversificação de angiospermas no ambiente terrestre afetou a biodiversidade de organismos terrestres, de maneira que existe uma associação entre as numerosas espécies de insetos e a radiação das angiospermas [Gaunt & Miles, 2002]. A presença da evidência fóssil de entomoparasitismo descrita por Sung *et al.*

[2008] correlaciona a variedade de insetos capazes de se alimentar de extratos vegetais com o conseqüente surgimento de fungos capazes de infectar insetos.

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam o maior número de genes para quitinases já descrito, com 36 genes em *T. virens* e 29 genes em *T. atroviride* [Druzhinina *et al.*, 2012]. Os autores sugerem que esse número elevado de genes de quitinases está relacionado a sua capacidade de infectar outros fungos, relação que também está presente não só quando em comparação com outros fungos não-micopatógenos, mas também entre as espécies do gênero, pois *T. reesei* (com 20 genes) é um micoparasita menos virulento do que *T. virens* (36) e *T. atroviride* (29). Considerando essa alternativa, é adequado supor que os genes "extras" que estão presentes em *T. virens* e *T. atroviride* teriam função na degradação de parede celular fúngica de espécies antagonistas, e esses genes "extras" são aqueles pertencentes ao subgrupo C.

No entanto, em *M. anisopliae* alguns dos genes de quitinases do sgC provavelmente foram perdidos pois o genoma apresenta apenas duas cópias não-funcionais (pseudogenes), além da ausência de dois ortólogos que estão presentes em *M. robertsii*. Estudos sugerem que genes relacionados ao estresse frequentemente são expostos a duplicações e perdas, enquanto genes relacionados ao desenvolvimento apresentam seleção contra a mudança no número de cópias [Wapinski *et al.*, 2007]. Um alto número de cópias de genes relacionados ao estresse pode ser benéfico para permitir adaptações a diferentes nichos ecológicos. Além disso, a diversificação de parálogos recentes, na sua maior parte, ocorre em nível de regulação e mais raramente em nível de função bioquímica. De fato, os parálogos A5 e A7 apresentaram um perfil de expressão distinto frente às condições testadas. ChiMaA5 foi induzido na condição de formação de apressório em relação ao conídio e A7 foi induzido na condição MCc (meio rico). Seguindo a ideia de Wapinski *et al.* [2007], os genes do sgC em *M. anisopliae* poderiam estar relacionados ao estresse do fungo pelas perdas de cópias que detectamos e os parálogos ChiMaA5 e A7 poderiam indicar ligação ao estresse pela sua duplicação. Um levantamento da presença dos 24 genes de quitinases em isolados de *Metarhizium* mostrou que vários genes não estão presentes em alguns destes isolados [Sbaraini, N. comunicação pessoal]. Isso sugere que provavelmente estes isolados foram submetidos a diferentes pressões seletivas e podem representar diferente espectro de hospedeiros.

Com a crescente descrição de genomas fúngicos as famílias gênicas puderam ser melhor estudadas e caracterizadas. Seidl *et al.* [2005] foram os primeiros a caracterizar a família das glicosil hidrolases GH18 em um fungo filamentoso, o micopatógeno *T. reesei*. Analisando a presença de domínios típicos nessa classe de enzimas, assim como as suas relações filogenéticas, foi proposta a classificação das quitinases em três subgrupos A, B e C. Posteriormente, Karlsson & Stenlid [2009] ampliaram a classificação dos genes da família GH18 para outros organismos, analisando também plantas, vírus, bactérias e fungos. Apesar desses dois trabalhos incluírem inúmeros genes que representaram os diferentes subgrupos GH18, dois grupos de genes em especial foram pouco destacados. Esses dois grupos foram detectados em nossa análise da família GH18 em *M. anisopliae* E6 e, para melhor classifica-los, nós propusemos o estabelecimento de dois novos subgrupos, sgD e sgE. A proteína Chi18-15 de *T. reesei* e suas ortólogas não foram classificadas em nenhum subgrupo de fungos por Karlsson & Stenlid [2008], pois foram agrupadas entre os dois subgrupos (sgB5 e B1). Na classificação que incluiu os diferentes organismos [Karlsson & Stenlid, 2009], essas proteínas foram classificadas juntamente com representantes de bactérias num subgrupo IVa (bactéria). Por já ter sido sugerido que a presença desse gene em genomas fúngicos foi originada de um evento de transferência gênica horizontal a partir de bactérias do gênero *Streptomyces* [Karlsson & Stenlid, 2009; Ihrmark *et al.*, 2010], é justificável que os ortólogos se agrupem com outros genes bacterianos. No entanto, na análise filogenética das quitinases de *M. anisopliae* a proteína ortóloga ChiMaD1 não se agrupou em uma mesma ramificação que as proteínas do sgB. Esta separação filogenética foi bem suportada nas árvores construídas, de maneira que decidiu-se não classificar a proteína ortóloga a Chi18-15 no subgrupo sgB nem no grupo IVa (bactéria). Estabelecemos um novo subgrupo de GH18 para fungos, o subgrupo D.

Além das proteínas do sgD, outro grupo de proteínas também não pode ser classificado no sgB. Algumas proteínas da família GH18 foram recentemente classificados como ENGases em espécies de *Trichoderma* e *Flammulina velutipes* [Hamaguchi *et al.*, 2010; Stals *et al.*, 2010; Tzelepis *et al.*, 2014] e essas proteínas foram anteriormente classificadas no sgB5 por Karlsson & Stenlid [2008 e 2009]. Entretanto, em *M. anisopliae* E6, considerando a possibilidade destas proteínas terem função enzimática de deglicosilação decidiu-se nomear as proteínas com essas características em um novo subgrupo E.

Apesar da quitinase ChiMaD1 (sgD) se aproximar filogeneticamente das ENGases preditas no subgrupo E, a proteína ortóloga de D1 (*Bbchit1*) em *B. bassiana* apresentou atividade quitinolítica comprovada, o que permite supor uma provável atividade quitinolítica de D1 (a qual apresenta 79% de identidade com *Bbchit1*). Por outro lado, as ENGases de *T. virens* e *T. atroviride*, assim como a de *F. velutipes*, além de apresentarem atividade de deglicosilação, em ensaio enzimático contendo glicol quitina ou quitina cristalina como substratos, essas enzimas não apresentaram atividade quitinolítica [Hamaguchi *et al.*, 2010; Stals *et al.*, 2010; Tzelepis *et al.*, 2014]. Esses fatos fortalecem a proposição dos dois subgrupos D e E para classificar as 24 proteínas GH18 presentes em *M. anisopliae*.

Em relação a atribuição de função para cada uma das proteínas GH18 contidas nos diferentes subgrupos de A-E, sabe-se que, apesar de ser esse o objetivo final ao estudar as quitinases, a construção desse conhecimento é complexa e será abordada em etapas. Estamos realizando a construção de mutantes para todas as quitinases do subgrupo C, D e E como também para ChiMaA4, A7, B1 e B5. A complexidade de estudar famílias multigênicas pode ser exemplificada nos relatos das quitinases da família GH18 em *A. fumigatus*, *Neurospora crassa* e espécies do gênero *Trichoderma*. Em *A. fumigatus*, na tentativa de elucidar o papel de todas as quitinases pertencentes a um mesmo subgrupo, foram construídos mutantes quintuplos [Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011]. Contudo, houve dificuldade em atribuir uma função específica para o subgrupo B como um todo, pois não foi possível perceber uma diferença significativa no mutante quintuplo além do fato de que essa linhagem apresentou desenvolvimento levemente reduzido durante a autólise e uma redução limitada na atividade quitinolítica total. Em *N. crassa* não foram deletados todos os membros de um mesmo subgrupo, no entanto, diversos mutantes foram construídos [Tzelepis *et al.*, 2012], mas não foram detectados efeitos fenotípicos em mutantes para quitinases do sgA, e a deleção do gene *chit-1* do sgB resultou apenas em crescimento reduzido em comparação com o tipo selvagem.

Apesar da complexidade de se atribuir função para genes de famílias multigênicas, a construção de mutantes únicos ou múltiplos é fundamental. Por exemplo, a deleção simultânea de quatro genes de quitina sintase das famílias 1 e 2 em *A. fumigatus* indicou diversos fenótipos diferentes da linhagem selvagem. Dentre as características celulares avaliadas em *A. fumigatus*, a morfologia dos conídios e das hifas, a conidiação e

desenvolvimento radial, síntese de quitina e a virulência, vários exibiram diferença significativa entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem. Inclusive, um dos aspectos mais relevantes foi o fato do mutante para um único gene de quitina sintase (*chsG*) exibir um fenótipo muito semelhante ao observado para o mutante quádruplo, o que revelou a importância desse gene para família gênica [Muszkieta *et al.*, 2014].

Um dos pontos negativos de estudar famílias gênicas por deleções de genes únicos é a possibilidade da ocorrência de uma compensação funcional que evitaria a observação de alterações fenotípicas. A compensação funcional foi observada para genes de quitina sintase em *C. albicans* [Walker *et al.*, 2013]. Quando foi construído um mutante para o gene essencial envolvido na formação do septo (*Chs1*), e o fungo foi submetido a estresse, outros genes de quitina sintase foram capazes complementar as atividades necessárias para a formação de septos, restaurando a viabilidade e a divisão celular da levedura. Os autores sugerem uma evolução de mecanismos redundantes para permitir a viabilidade celular em condições de estresse severo. Apesar de essa hipótese poder ser uma das explicações para o elevado número de cópias em famílias gênicas, não foi detectado um padrão de indução ou repressão aplicável a todos os genes de quitinases em nossas análises de perfis de expressão, nem mesmo para genes de um mesmo subgrupo. Portanto, apesar de poder haver certa redundância de função para algumas das quitinases, ainda não está determinado quantas delas responderiam a deleção de uma das cópias, nem se essa compensação funcional ocorreria por genes do mesmo subgrupo daquele que foi deletado.

Quitinases múltiplas também podem atuar como um sistema de segurança para a presença de inibidores de atividade de insetos, o que exemplificaria um tipo de co-evolução entre patógenos e seus hospedeiros. É possível que a interação com o substrato não seja de todo específica, mas que outras características enzimáticas interfiram na função preferencial de determinada quitinase como, por exemplo, interações com inibidores, estabilidade enzimática, atividade em diferentes pHs, etc.

A família GH18 das quitinases foi detalhadamente estudada em espécies do gênero *Trichoderma*. Perfis de expressão de diversos genes foram analisados e houve sobreposição de funções entre diferentes quitinases as quais apresentaram envolvimento na degradação da parede celular tanto do próprio fungo analisado (intraespecífica) como do fungo antagonista (interespecífica). Após diversas análises comparativas entre essas espécies, Gruber & Seidl-Seiboth [2012] sugerem que a regulação que induz a degradação

da parede celular fúngica (inter ou intraespecífica) não é devida a uma especiação de quitinases individuais, mas que ao invés disso, essa regulação é feita simplesmente pela acessibilidade ao substrato. O substrato (quitina) pode estar protegido, como em hifas saudáveis, ou desprotegido como durante o micoparasitismo ou durante a autólise de hifas mais antigas, por exemplo.

Dados de expressão fornecem um primeiro panorama indicando em qual etapa do ciclo de infecção ou em qual tipo celular as respectivas enzimas podem estar envolvidas. No entanto, uma caracterização bioquímica poderá auxiliar na determinação da especificidade do substrato e na correspondente função biológica de cada enzima.

4. Conclusões

- ✓ As 24 proteínas pertencentes a família 18 das glicosil hidrolases de *M. anisopliae* podem ser classificadas em cinco diferentes subgrupos em conformidade com as suas relações filogenéticas;
- ✓ Dois novos subgrupos, o subgrupo D e o subgrupo E, foram propostos para acomodar de maneira mais coerente 4 proteínas GH18 que se agruparam em uma ramificação separada dos outros subgrupos previamente descritos A, B e C;
- ✓ Das 24 proteínas GH18 de *M. anisopliae*, 9 pertencem ao sgA, 7 ao sgB, 4 ao sgC, 1 ao sgD e 3 ao sgE;
- ✓ O subgrupo D proposto, que inclui a proteína ChiMaD1 de *M. anisopliae*, é composto de proteínas ortólogas a Chi18-15 de *T. reesei*, a qual foi adquirida por transferência horizontal a partir de *Streptomyces*;
- ✓ O subgrupo E proposto é composto de proteínas que contém o domínio GH18 e potencialmente apresentam função na deglicosilação de proteínas, sendo portanto designadas como ENGases;
- ✓ *M. anisopliae* apresenta 3 proteínas ortólogas a ENGases que foram classificadas nesse subgrupo E, nomeadas MaEng18A, MaEng18B e MaEng18C, de acordo com os ortólogos caracterizados em *Trichoderma*;
- ✓ O subgrupo C de *M. anisopliae* tem um número reduzido de genes em comparação com *M. robertsii*, pois dois ortólogos do sgC estão ausentes e outros dois são pseudogenes;
- ✓ Os genes GH18 de *M. anisopliae* linhagem E6 não apresentaram um padrão de indução ou repressão de sua expressão comum a todos os membros dessa família gênica, o que sugere que esses genes não são redundantes em termos funcionais;
- ✓ Não houve padrão de expressão comum entre todos os genes de um determinado subgrupo de proteínas GH18, no entanto, todos os genes do sgB parecem apresentar uma relação de indução com a condição de quitina 1 %, o que não ocorre para os genes dos outros subgrupos;
- ✓ Os genes do sgC apresentaram os menores níveis de expressão quando comparados com os outros genes GH18;

- ✓ Os genes que aparentam estar mais relacionados as condições de infecção e, portanto, são bons candidatos para análise funcional por deleção são A5 e B7;
- ✓ A construção de mutantes para os genes C1, C3 e C4 foi confirmada em uma primeira etapa por PCR utilizando DNA extraídos de esporos;
- ✓ A frequência de potenciais transformantes nulos para os genes das quitinases C1, C3 e C4 foi reduzida (4,8, 8 e 0,7% respectivamente).

5. Perspectivas

- ✓ Analisar a história evolutiva das quitinases de *M. anisopliae* para prever quais as proteínas ancestrais que teriam funções mais relacionadas aos mecanismos básicos celulares e menos ao processo de infecção de hospedeiros artrópodes;
- ✓ Realizar a predição das estruturas terciárias das quitinases para inferir mecanismos enzimáticos de catálise;
- ✓ Realizar a construção de mutantes funcionais deletados para a quitinase ChiMaC2 por ATMT, preferencialmente utilizando mutantes $\Delta ku70$ de *M. anisopliae*;
- ✓ Analisar funcionalmente as quitinases do sgC estudando os mutantes para os genes C1, C2, C3 e C4 em ensaios fenotípicos e bioensaios contra diferentes hospedeiros (*D. peruvianus* e *R. microplus*);
- ✓ Realizar a construção de mutantes para as quitinases A5 e B7 e analisar sua participação na virulência de *M. anisopliae* frente a seus hospedeiros;
- ✓ Analisar as regiões promotoras das quitinases para buscar sítios de ligação a fatores de transcrição e inferir possível relação com a da função dos genes;

6. Referências

1. Abbott RJ, Marzluf GA (1984) Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. J Bacteriol 159: 505-510.
2. Adams DJ (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology 150: 2029-2035.
3. Alcazar-Fuoli L, Clavaud C, Lamarre C, Aïmanianda V, Seidl-Seiboth V, *et al.* (2011) Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol 48: 418-429.
4. Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ (2012) Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. Science 336: 1576-1577.
5. Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101: 512-530.
6. Bogo MR, Rota CA, Pinto H, Jr., Ocampos M, Correa CT, *et al.* (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. Curr Microbiol 37: 221-225.
7. Boldo JT, do Amaral KB, Junges A, Pinto PM, Staats CC, *et al.* (2010) Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. Gene 462: 1-7.
8. Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH, *et al.* (2009) Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. Curr Genet 55: 551-560.
9. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J 382: 769-781.
10. Bourgeois C, Kuchler K (2012) Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. Front Cell Infect Microbiol 2: 142.
11. Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008) Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 80: 381-388.
12. Braun EL, Halpern AL, Nelson MA, Natvig DO (2000) Large-scale comparison of fungal sequence information: mechanisms of innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*. Genome Res 10: 416-430.
13. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, *et al.* (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res 37: D233-238.
14. Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A (1994) Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 10903-10907.

15. Carvalho ND, Arentshorst M, Jin Kwon M, Meyer V, Ram AF (2010) Expanding the ku70 toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 1463-1473.
16. Chantret I, Frenoy JP, Moore SE (2003) Free-oligosaccharide control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: roles for peptide:N-glycanase (Png1p) and vacuolar mannosidase (Ams1p). *Biochem J* 373: 901-908.
17. Charnley AK (1991) Microbial pathogens and insect pest control. *Letters in Applied Microbiology* 12: 149-157.
18. Colussi PA, Specht CA, Taron CH (2005) Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71: 2862-2869.
19. Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* 33: 155-171.
20. da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, *et al.* (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. *Res Microbiol* 156: 382-392.
21. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 773-782.
22. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
23. Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, *et al.* (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13: 414-430.
24. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, *et al.* (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9: 749-759.
25. Duan Z, Shang Y, Gao Q, Zheng P, Wang C (2009) A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environ Microbiol* 11: 2351-2360.
26. Dubey MK, Ubhayasekera W, Sandgren M, Jensen DF, Karlsson M (2012) Disruption of the Eng18B ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One* 7: e36152.
27. Dunkler A, Walther A, Specht CA, Wendland J (2005) *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 42: 935-947.
28. Eijsink V, Hoell I, Vaaje-Kolstada G (2010) Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnol Genet Eng Rev* 27: 331-366.
29. Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G, Varum KM, Horn SJ (2008) Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol* 26: 228-235.
30. Eirin-Lopez JM, Rebordinos L, Rooney AP, Rozas J (2012) The birth-and-death evolution of multigene families revisited. *Genome Dyn* 7: 170-196.

31. Engler R, Rogoff MH (1976) Entomopathogens: ecological manipulation of natural associations. *Environ Health Perspect* 14: 153-159.
32. Fan J, Han P, Chen X, Hu Q, Ye M (2014) Comparative proteomic analysis of *Bombyx mori* hemocytes treated with destruxin A. *Arch Insect Biochem Physiol* 86: 33-45.
33. Fang W, Pava-ripoll M, Wang S, St Leger R (2009) Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol* 46: 277-285.
34. Fang W, Pei Y, Bidochka MJ (2007) A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology* 153: 1017-1025.
35. Faria MRd, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256.
36. Funkhouser JD, Aronson NN, Jr. (2007) Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 7: 96.
37. Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, *et al.* (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7: e1001264.
38. Gaunt MW, Miles MA (2002) An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol Biol Evol* 19: 748-761.
39. Geng J, Plenefisch J, Komuniecki PR, Komuniecki R (2002) Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 124: 11-21.
40. Giuliano Garisto Donzelli B, Krasnoff SB, Moon YS, Churchill AC, Gibson DM (2012) Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. *Curr Genet* 58: 105-116.
41. Gooday G (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiology Letters* 100: 387-391.
42. Gooday GW (1999) Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS* 87: 157-169.
43. Gruber S, Kubicek CP, Seidl-Seiboth V (2011b) Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. *Appl Environ Microbiol* 77: 7217-7226.
44. Gruber S, Seidl-Seiboth V (2012) Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34.
45. Gruber S, Vaaje-Kolstad G, Matarese F, Lopez-Mondejar R, Kubicek CP, *et al.* (2011a) Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology* 21: 122-133.

46. Hajek AE, St. Leger RJ (1994) Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. Annual Review of Entomology 39: 293-322.
47. Hamaguchi T, Ito T, Inoue Y, Limpaseni T, Pongsawasdi P, *et al.* (2010) Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. Glycobiology 20: 420-432.
48. Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol 93: 533-543.
49. Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, Zanotto PM, Howard SC, *et al.* (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology 212: 673-685.
50. Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J 280 (Pt 2): 309-316.
51. Hollis T, Monzingo AF, Bortone K, Ernst S, Cox R, *et al.* (2000) The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Protein Sci 9: 544-551.
52. Honda Y, Taniguchi H, Kitaoka M (2008) A reducing-end-acting chitinase from *Vibrio proteolyticus* belonging to glycoside hydrolase family 19. Appl Microbiol Biotechnol 78: 627-634.
53. Hsiang T, Baillie DL (2006) Issues in comparative fungal genomics. 6: 99-122.
54. Ihrmark K, Asmail N, Ubhayasekera W, Melin P, Stenlid J, *et al.* (2010) Comparative molecular evolution of *Trichoderma* chitinases in response to mycoparasitic interactions. Evol Bioinform Online 6: 1-26.
55. Isaka M, Kittakoop P, Kirtikara K, Hywel-Jones NL, Thebtaranonth Y (2005) Bioactive substances from insect pathogenic fungi. Acc Chem Res 38: 813-823.
56. Jiang D, Zhu W, Wang Y, Sun C, Zhang KQ, *et al.* (2013) Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. Biotechnol Adv 31: 1562-1574.
57. Kaaya GP, Munyinyi DM (1995) Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. J Invertebr Pathol 66: 237-241.
58. Karlsson M, Stenlid J (2008) Comparative evolutionary histories of the fungal chitinase gene family reveal non-random size expansions and contractions due to adaptive natural selection. Evol Bioinform Online 4: 47-60.
59. Karlsson M, Stenlid J (2009) Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. J Mol Microbiol Biotechnol 16: 208-223.
60. Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA (2014) Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. Mycologia 106: 811-829.
61. Kim HG, Song H, Yoon DH, Song BW, Park SM, *et al.* (2010) *Cordyceps pruinosa* extracts induce apoptosis of HeLa cells by a caspase dependent pathway. J Ethnopharmacol 128: 342-351.

62. Klemsdal SS, Clarke JL, Hoell IA, Eijsink VG, Brurberg MB (2006) Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (*ech30*) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS Microbiol Lett* 256: 282-289.
63. Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, *et al.* (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40.
64. Kuranda MJ, Robbins PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266: 19758-19767.
65. Lacey CM, Lacey LA, Roberts DR (1988) Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *J Invertebr Pathol* 52: 108-118.
66. Liao X, Fang W, Lin L, Lu HL, St Leger RJ (2013) *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization. *PLoS One* 8: e78118.
67. Liu ZH, Yang Q, Hu S, Zhang JD, Ma J (2008) Cloning and characterization of a novel chitinase gene (*chi46*) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 241-252.
68. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: D490-495.
69. Lord JC (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol* 89: 19-29.
70. Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CM, Aljanabi SM (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 839-846.
71. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L (1997) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10: 369-400.
72. MartÃ-nez JP, Falomir MaP, Gozalbo D (2009) Chitin: A Structural Biopolysaccharide.
73. McCreath KJ, Specht CA, Liu Y, Robbins PW (1996) Molecular cloning of a third chitinase gene (CHT1) from *Candida albicans*. *Yeast* 12: 501-504.
74. McNeill J BW, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012) International code of nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne code). Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books.
75. Moon YS, Donzelli BG, Krasnoff SB, McLane H, Griggs MH, *et al.* (2008) *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Appl Environ Microbiol* 74: 4366-4380.
76. Morissette DC, Seguin P, Jabaji-Hare SH (2006) Expression regulation of the endochitinase-encoding gene *sechi44* from the mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Can J Microbiol* 52: 1103-1109.

77. Muszkieta L, Aimaganianda V, Mellado E, Gribaldo S, Alcazar-Fuoli L, *et al.* (2014) Deciphering the role of the chitin synthase families 1 and 2 in the in vivo and in vitro growth of *Aspergillus fumigatus* by multiple gene targeting deletion. *Cell Microbiol.* (Published before inclusion in an Issue, doi: 10.1111/cmi.12326).
78. Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39: 121-152.
79. Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Front Microbiol* 5: 75.
80. Nikolov S, Fabritius H, Petrov M, Friak M, Lymperakis L, *et al.* (2011) Robustness and optimal use of design principles of arthropod exoskeletons studied by ab initio-based multiscale simulations. *J Mech Behav Biomed Mater* 4: 129-145.
81. NL FAG (1996) PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Stock Center Newsletter* 43: 25-26.
82. Novotny V, Basset Y, Miller SE, Weiblen GD, Bremer B, *et al.* (2002) Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature* 416: 841-844.
83. Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, *et al.* (1996) A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol* 178: 5065-5070.
84. Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, *et al.* (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2: 1169-1180.
85. Pinto AdS, Barreto CC, Vainstein MH, Schrank A, Ulhoa CJ (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 322-327.
86. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, *et al.* (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol* 20: 200-206.
87. Pusztahelyi T, Molnar Z, Emri T, Klement E, Miskei M, *et al.* (2006) Comparative studies of differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol (Praha)* 51: 547-554.
88. Roberts DW (1989) World picture of biological control of insects by fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 89-100.
89. Roberts DW, St Leger RJ (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54: 1-70.
90. Saito A, Ozaki K, Fujiwara T, Nakamura Y, Tanigami A (1999) Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member. *Gene* 239: 325-331.
91. Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A, Koseki K (1986) The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* Sp. *Tetrahedron Letters* 27: 2475-2478.

92. Scholte EJ, Knols BG, Takken W (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol* 91: 43-49.
93. Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274.
94. Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42.
95. Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP (2005) A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* 272: 5923-5939.
96. Sevim A, Donzelli BG, Wu D, Demirbag Z, Gibson DM, *et al.* (2012) Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Curr Genet* 58: 79-92.
97. Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 413-423.
98. Shin KS, Kwon NJ, Kim YH, Park HS, Kwon GS, *et al.* (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8: 738-746.
99. Soanes DM, Alam I, Cornell M, Wong HM, Hedeler C, *et al.* (2008) Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. *PLoS One* 3: e2300.
100. St Leger RJ (2008) Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J Invertebr Pathol* 98: 271-276.
101. Staats CC, Junges A, Fitarelli M, Furlaneto MC, Vainstein MH, *et al.* (2007) Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 945-950.
102. Staats CC, Kmetzsch L, Lubeck I, Junges A, Vainstein MH, *et al.* (2013) *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biol* 117: 137-144.
103. Staats CC JA, Guedes RLM, Thompson CT, Morais GL, Boldo JT, Almeida LGP, *et al.* (2014) Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. Accepted to *BMC Genomics* on 29 August 2014.
104. Stals I, Samyn B, Sergeant K, White T, Hoorelbeke K, *et al.* (2010) Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *FEMS Microbiol Lett* 303: 9-17.
105. Steinberg G, Perez-Martin J (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* 18: 61-67.
106. Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, *et al.* (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5-59.

107. Sung GH, Poinar GO, Jr., Spatafora JW (2008) The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Mol Phylogenet Evol* 49: 495-502.
108. Suzuki T, Funakoshi Y (2006) Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. *Glycoconj J* 23: 291-302.
109. Terwisscha van Scheltinga AC, Hennig M, Dijkstra BW (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol* 262: 243-257.
110. Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, *et al.* (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523.
111. Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T, *et al.* (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1063-1070.
112. Tseng MN, Chung PC, Tzean SS (2011) Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol* 77: 4508-4519.
113. Tzelepis G, Hosomi A, Hossain TJ, Hirayama H, Dubey M, *et al.* (2014) Endo-beta-N-acetylglucosamidases (ENGases) in the fungus *Trichoderma atroviride*: Possible involvement of the filamentous fungi-specific cytosolic ENGase in the ERAD process. *Biochem Biophys Res Commun* 449: 256-261.
114. Tzelepis GD, Melin P, Jensen DF, Stenlid J, Karlsson M (2012) Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 49: 717-730.
115. Ueda M, Kojima M, Yoshikawa T, Mitsuda N, Araki K, *et al.* (2003) A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. *Eur J Biochem* 270: 2513-2520.
116. Vega K, Kalkum M (2012) Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol* 2012: 920459.
117. Walker LA, Lenardon MD, Preechasuth K, Munro CA, Gow NA (2013) Cell wall stress induces alternative fungal cytokinesis and septation strategies. *J Cell Sci* 126: 2668-2677.
118. Wang C, Duan Z, St Leger RJ (2008) MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell* 7: 302-309.
119. Wang C, St Leger RJ (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6647-6652.
120. Wang C, St Leger RJ (2007) The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *J Biol Chem* 282: 21110-21115.
121. Wang C, St Leger RJ (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* 6: 808-816.

122. Wapinski I, Pfeffer A, Friedman N, Regev A (2007) Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449: 54-61.
123. Ward OP (2012) Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* 30: 1119-1139.
124. Wessels JGH (1994) Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. *Annual Review of Phytopathology* 32: 413-437.
125. Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, *et al.* (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 2: 483.
126. Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* 45: 963-972.
127. Yamazaki H, Yamazaki D, Takaya N, Takagi M, Ohta A, *et al.* (2007) A chitinase gene, chiB, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 51: 89-98.
128. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, *et al.* (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41: 973-981.
129. Zhao H, Xu C, Lu HL, Chen X, St Leger RJ, *et al.* (2014) Host-to-pathogen gene transfer facilitated infection of insects by a pathogenic fungus. *PLoS Pathog* 10: e1004009.
130. Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu X, *et al.* (2011) Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol* 12: R116.
131. Zheng P, Xia Y, Zhang S, Wang C (2013) Genetics of *Cordyceps* and related fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 2797-2804.

CURRICULUM VITÆ

JUNGES, A.

Dados pessoais

Nome Ângela Junges
Nascimento 28/03/1981 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 000.779.820-29
e-mail ajunges@cbiot.ufrgs.br

Formação acadêmica/titulação

- 2010** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Quitinases do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*
 Orientador: Augusto Schrank
 Co-orientador: Marilene Henning Vainstein
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2010** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: *Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases, Ano de obtenção: 2010
 Orientador: Augusto Schrank
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Expressão do peptídeo tóxico Jaburetox da leguminosa *Canavalia ensiformis* no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*
 Orientador: Augusto Schrank
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2007 - 2007** Extensão universitária em Introdução a Biologia Molecular Computacional. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biologia Molecular de Fungos Patogênicos Humanos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Clonagem e Expressão em Sistema Gateway. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional**1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS**

- 2010 - Atual** Vínculo: Aluno de doutorado, Enquadramento funcional: Bolsista de Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva
- 2008 - 2010** Vínculo: Aluno de Mestrado, Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva
- 2004 - 2007** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva

2. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

- 2007 - 2007** Vínculo: Estágio Curricular, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 16, Regime: Parcial. Estágio Supervisionado, Seção de Micologia.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Perinotto, Wendell M.S., Golo, Patricia S., Rodrigues, Caio J.B. Coutinho, Sá, Fillipe A., Santi, Lucélia, Silva, Walter O. Beys da, **Junges, Angela**, Vainstein, Marilene H., Schrank, A., Salles, Cristiane M.C., Bittencourt, Vânia R.E.P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* (Print), v.1, p.1 - 10, 2014.
2. Staats, Charley Christian, Kmetzsch, Livia, Luberck, Irina, **Junges, Angela**, Vainstein, Marilene Henning, Schrank, Augusto. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biology*, v.117, p.137 - 144, 2013.
3. Boldo, Juliano Tomazzoni, Amaral, Karina Bohrer do, **Junges, Angela**, Pinto, Paulo Marcos, Staats, Charley Christian, Vainstein, Marilene Henning, Schrank, Augusto Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. *Gene* (Amsterdam),v.462, p.1 - 7, 2010.
4. Boldo, Juliano Tomazzoni, **Junges, Angela**, Amaral, Karina Bohrer, Staats, Charley Christian, Vainstein, Marilene Henning, Schrank, Augusto Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*, v.55, p.551 - 560, 2009.
5. Staats, Charley C., **Junges, Angela**, Fitarelli, Mariana, Furlaneto, M., Vainstein, Marilene H., Schrank, Augusto. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*,v.Jul, p.945 - 950, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, E. S., **JUNGES, A.**, PAIXAO, R. L. A., RISPOLI, T., SBARAINI, N., STAATS, C. C., SCHRANK, A. Estudo funcional de N-acetil-glicosaminidases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.
2. **JUNGES, A.**, PAIXAO, R. L. A., OLIVEIRA, E. S., SBARAINI, N., RISPOLI, T., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Functional analysis from *Metarhizium anisopliae* subgroup C chitinases In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal.
3. PAIXAO, R. L. A., **JUNGES, A.**, OLIVEIRA, E. S., STAATS, C. C., SCHRANK, A. Gene silencing mediated by RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
4. SBARAINI, N., **JUNGES, A.**, RISPOLI, T., MINGORI, M. R., SCHRANK, A. Diversity of chitinases amongst *Metarhizium anisopliae* isolates In: 28 Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu.
5. RISPOLI, T., **JUNGES, A.**, SCHRANK, A. Functional analysis from chimaA4 chitinase from *Metarhizium anisopliae* In: 28 Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu.
6. **JUNGES, A.**, BROETTO, L., ALMEIDA, L. G. P., Vasconcelos, A.T.R., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Transcriptional profiles of 23 chitinases from *Metarhizium anisopliae* In: 28 Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu.

7. **JUNGES, A.**, MARTINELLI, A. H., BROETTO, L., BOLDO, J. T., VAINSTEIN, M. H., CARLINI, C. R., SCHRANK, A. Expressão do peptídeo tóxico Jaburetox da leguminosa *Canavalia ensiformis* no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
8. BOLDO, J. T., **JUNGES, A.**, VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Análise dos Transcritos do Gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.
9. **JUNGES, A.**, BOLDO, J. T., SCHRANK, I.S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. Expressão da quitinase codificada pelo gene *chi2* de *Metarhizium anisopliae* em *Escherichia coli* In: XVIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2006, Porto Alegre.
10. STAATS, C. C., FITARELLI, M., **JUNGES, A.**, FURLANETO, M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene targeting applied to *Metarhizium anisopliae* In: 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia - SP.
11. PALMA, L.P., STAATS, C. C., **JUNGES, A.**, BOLDO, J. T., BROETTO, L., SOUZA, T.S.F., SILVEIRA, C.P., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Análise do Padrão de Expressão dos Genes *chit1*, *chi2* e *chi3* em condições vegetativas e de infecção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP.
12. BOLDO, J. T., **JUNGES, A.**, BROETTO, L., NAKAZOTO, L., BARATTO, C.M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Construção de uma linhagem de *Metarhizium anisopliae* superexpressando a quitinase codificada pelo gene *chi2* In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP.
13. **JUNGES, A.**, STAATS, C. C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. Desenvolvimento de um sistema de inativação gênica em *Metarhizium anisopliae* In: XVII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2005, Porto Alegre.
14. STAATS, C. C., **JUNGES, A.**, FITARELLI, M., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. Inativação Gênica em *Metarhizium anisopliae* In: VI Reunião Anual do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre.