

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

**ANÁLISE FUNCIONAL DE QUATRO GENES
PUTATIVOS DA FAMÍLIA GH18 DE GLICOSIL
HIDROLASES NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
*Metarhizium anisopliae***

Nicolau Sbaraini Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso

Prof. Augusto Schrank
Orientador

Porto Alegre, 2014

Nicolau Sbaraini Oliveira

**ANÁLISE FUNCIONAL DE QUATRO GENES
PUTATIVOS DA FAMÍLIA GH18 DE GLICOSIL
HIDROLASES NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
*Metarhizium anisopliae***

Monografia apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da UFRGS, Ênfase Biotecnologia Molecular.

Prof. Augusto Schrank

Orientador

Porto Alegre, 2014

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

AGRADECIMENTOS

Existem várias pessoas que foram importantes no desenvolvimento deste trabalho por vários motivos. Gostaria de agradecer primariamente as agências fomentadoras (meus pais e família) e a minha namorada, que foi fundamental em meu desenvolvimento pessoal. Te amo Luiza!

Agradeço enormemente ao Prof. Augusto Schrank e a Profa. Marilene Vainstein pela oportunidade e confiança. Aos Professores Charley Staats e Lívia Kmetzsch Rosa e Silva por me ajudarem sempre que eu precisei.

A Ângela e o Eder! Sem eles eu nunca teria conseguido! E aos demais colegas dos laboratórios 217 e 220! Como são muitos não vou citar um a um!

E aos meus colegas de graduação, sempre presentes ao longo dos 5 anos!

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosso entomopatogênico, da ordem Hypocreales, que infecta um grande número de espécies de artrópodes. Este fungo caracteriza-se por ser um dos primeiros organismos a ser aplicado em larga escala para o controle de insetos-praga na Agricultura. A penetração através da carapaça do hospedeiro constitui sua via preferencial de infecção, sendo esta a primeira barreira a ser superada. Com composições variáveis, na maioria dos artrópodes a carapaça é, geralmente, rica em quitina. A quitina é um polissacarídeo composto por monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) que também está presente na parede celular de fungos filamentosos. Para transpassar essa barreira, o fungo combina diferentes estratégias, como pressão mecânica e a dissolução da cutícula pela secreção de diversas enzimas hidrolíticas. Dentre as enzimas secretadas estão as quitinases, responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 entre monômeros GlcNAc. Em fungos, as quitinases não apresentam apenas importância nutricional, participando ativamente de processos morfogênicos e autolíticos. Quitinases e endo- β -D-N-acetilglicosaminidases (ENGases) são membros da família GH18 de glicosil hidrolases em fungos filamentosos. As ENGases catalisam uma reação de hidrólise semelhante à das quitinases, porém utilizando N-oligosacarídeos como substrato, em detrimento a quitina, em uma reação de deglicosilação. Uma análise genômica realizada em nosso laboratório, na linhagem E6 de *M. anisopliae*, identificou vinte e quatro genes putativos contendo o domínio GH18, os quais foram classificados em cinco subgrupos, baseado em similaridade de sequências, relações filogenéticas, presença de domínios e características funcionais. Com nove genes agrupados no subgrupo A, sete genes no B, quatro genes no C, um gene no subgrupo D e três genes em um subgrupo contendo ENGases. A importância do gene do subgrupo D (*chimaD1*) e dos genes do subgrupo das ENGases (*MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C*), permanece ainda desconhecida em *M. anisopliae*. O presente estudo visou avaliar, pela construção de mutantes funcionais, a importância destes genes no ciclo de vida do fungo. Análises filogenéticas foram conduzidas, levantando hipóteses sobre a evolução do gene *ChimaD1*, e das ENGases de fungos. Diferindo de outros fungos filamentos analisados, que possuem apenas uma ENGase putativa secretada e outra cópia com possível atividade citosólica, *M. anisopliae* possui dois possíveis parálogos com

peptídeo sinal predito. A presença destes dois genes pode estar correlacionada ao estilo de vida de do fungo. Um mutante nulo para o gene *chimaD1* foi construído, e construções de mutantes nulos para os demais genes estão em andamento. Futuras análises fenotípicas destes mutantes devem auxiliar na compreensão de diversos aspectos do ciclo de vida e da importância da família GH18 em fungos.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus of Hypocreales order that infects a huge range of arthropod species worldwide, being one of the first organisms widely applied to control crop pests. The fungal penetration through host cuticle constitutes the preferential route to establish *M. anisopliae* infection, and it is the first barrier to be surpassed to obtain a successful infection. Exhibiting a variable composition, the cuticle is a chitin-rich structure in many arthropods. The chitin, an N-acetylglucosamine (GlcNAc) polysaccharide is also found in filamentous fungi cell wall. In order to surpass the host cuticle barrier, the fungus combines different strategies, such as mechanical pressure and secretion of several hydrolytic enzymes. Among these secreted enzymes there are chitinases. These enzymes are responsible for catalyze the hydrolysis of β -1,4 glycosidic bonds between GlcNAc monomers. In fungi, chitinases presents not only nutritional importance, but also exhibit morphogenic and autolytic functions, acting at different processes of fungal development and life cycle maintenance. In filamentous fungi glycoside hydrolase family 18 (GH18) contains enzymes with chitinase and endo- β -D-N-acetylglucosaminidases (ENGases) activity. The ENGases are similar to chitinases, catalyzing a similar hydrolysis reaction but using N-oligosaccharides as substrate instead of chitin, in a deglycosylation. A genomic analysis performed in our laboratory, in *M. anisopliae* E6 strain, identified twenty-four putative genes containing the GH18 domain, which were classified five subgroups. Nine genes were assigned to subgroup A, seven genes to B, four to C, one gene to D and three genes to a subgroup containing only ENGases. This classification was based on sequence similarity, domains organization, phylogenetic relationship and functional features. The importance of subgroup D gene (*chimaD1*) and the genes from ENGase subgroup (*MaEng18A*, *MaEng18B* and *MaEng18C*) remains unknown in *M. anisopliae*. The present study aims to evaluate, through the construction of knockout mutants, the function of these genes in the fungus life cycle. Differing from other filamentous fungi analyzed, which have two ENGases, one putatively secreted and other with possible cytosolic activity, *M. anisopliae* has two putative secreted ENGases. This difference could be related with fungus life style. Phylogenetic analyses were conducted, raising hypotheses about *chimaD1* and fungal ENGases evolution. A *ChimaD1* knockout strain has been created, as well as knockout strains

for the others genes are in progress. Future phenotypic analysis of these knockout strains could help explaining some aspects from fungi life cycle and the importance of GH18 family.

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1	Controle Biológico	14
1.2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	15
1.2.1	Características e Taxonomia do Gênero <i>Metarhizium</i>	15
1.2.2	Interação <i>Metarhizium</i> -Hospedeiro	17
1.3	Glicosil Hidrolases.....	22
1.3.1	Quitinases	22
1.3.2	ENGases	26
1.3.3	Família GH18 em <i>M. anisopliae</i>	29
1.4	Glicosilação	34
1.3.1	N-glicosilação	35
1.4.1	<i>Endoplasmic-reticulum associated protein degradation</i> (ERAD)	37
2	JUSTIFICATIVAS	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Análises Filogenéticas, Predição de Domínios e Sítios.....	41
4.2	Linhagens, Reagentes e Meios de Cultura.....	41
4.3	Cassetes de Deleção para a construção de Mutantes Funcionais.....	43
4.4	Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT) e Confirmação dos Mutantes funcionais para o gene <i>chimaD1</i>	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Análises Filogenéticas, Predição de Domínios e Sítios.....	47
5.1.1	Análises <i>in silico</i> da quitinase MaChiMaD1 de <i>M. anisopliae</i>	50
5.1.2	Análises <i>in silico</i> da ENGase MaEng18B.....	53

5.1.2.1 PNGase de <i>M. anisopliae</i>	55
5.1.3 Análises <i>in silico</i> das ENGases MaEng18A e MaEng18C.....	56
5.2 Cassetes de Deleção para a construção de Mutantes Funcionais.....	58
5.3 Transformação Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT) e Confirmação dos Mutantes funcionais para o gene <i>chimaD1</i>	61
5.4 Marca de Resistência a Chlorimuron-etil.....	64
6 CONCLUSÕES	69
7 PERSPECTIVAS.....	69
8 REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto morfológico da linhagem E6 de <i>M. anisopliae</i> .	15
Figura 2: Diferenças morfológicas entre linhagens de <i>M. anisopliae</i> .	16
Figura 3: Ciclo infeccioso de <i>M. anisopliae</i> .	17
Figura 4: Vias de infecção, crescimento e reprodução de diferentes fungos entomopatogênicos.	18
Figura 5: Vias catabólicas e anabólicas da quitina em fungos filamentosos.	24
Figura 6: Modo de ação de ENGases e de enzimas envolvidas no catabolismo de quitina.	29
Figura 7: Os vinte e quatro genes da família GH18 de <i>M. anisopliae</i> e seus domínios.	30
Figura 8: Diagrama de Venn demonstrando Comparação do número de genes da família GH18 entre espécies do gênero <i>Metarhizium</i> .	31
Figura 9: Árvore filogenética contendo genes da família GH18 de <i>M. anisopliae</i> e <i>H. jecorina</i> .	33
Figura 10: Os tipos mais comuns de glicosilação.	33
Figura 11: Esquema teórico de realização do projeto.	43
Figura 12: Motivos e resíduos importantes para a catálise das ENGases.	47
Figura 13: Árvore filogenética agrupando ortólogos da quitinase MaChiMaD1.	49
Figura 14: Árvore filogenética agrupando ortólogos da ENGase MaEng18B.	52
Figura 15: Sequência de aminoácidos da tríade catalítica das PNGases de diferentes fungos.	53
Figura 16: Árvore filogenética agrupando ortólogos de MaEng18A e MaEng18C.	55
Figura 17: Clivagem de confirmação do vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1.	57
Figura 18: Clivagem de confirmação do vetor pPZP201BK- Δ MaEng18C.	58
Figura 19: Clivagem de confirmação do vetor pCR2.1- Δ MaEng18A.	58
Figura 20: PCR de confirmação dos mutantes.	60
Figura 21: PCR Multiplex de confirmação dos mutantes.	631
Figura 22: <i>Southern blotting</i> para seis mutantes selecionados através da análise prévia por PCR.	631
Figura 23: Clivagens de confirmação dos vetores pPZP201BK-Sur (A) e pPZP201BK-Sur/Bar (B).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	42
Tabela 2: Matriz de identidade de aminoácidos agrupando ortólogos da quitinase MaChiMaD1.	52
Tabela 3: Matriz de Identidade de aminoácidos das PNGases de diferentes fungos da ordem Hypocreales.	56

LISTA DE ABREVIÇÕES

AS	Ácido Siálico
ATMT	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes
CBM	Domínios de ligação a carboidrato
CG	Complexo de Golgi
Dol-PP	Dolicol fosfato
EF-1 α	<i>Elongation factor 1-alpha</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENGase	Endo- β -D-N-acetilglicosaminidase
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum associated protein degradation</i>
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GH	Glicosil hidrolases
Glc	Glicose
GlcA	Ácido Glucorônico
GlcNAc	N-acetilglicosamina
IdoA	Ácido Idurônico
ITS	<i>Internal transcribed spacers</i>
kb	Quilobase
LB	Luria-Bertani
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
Man	Manose
MCc	Meio de Cove Completo
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>

OT	Oligosacaril-transferase
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PNGase	Peptidil-N-glicosidases
RE	Retículo Endoplasmático
RNAi	RNA de interferência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLIC	<i>Sequence- and ligation independente cloning</i>
THG	Transferência horizontal gênica
Xyl	Xilose

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Controle Biológico

O controle biológico é um fenômeno natural onde uma população de indivíduos alvo tem seu número controlado pela ação de um inimigo natural. Tais inimigos naturais mantêm relações de predação, parasitismo, herbívora, ou outros mecanismos, podendo ser empregados pelo homem, com o objetivo de controlar a população de uma praga alvo. O controle biológico clássico consiste na introdução, controlada e proposital, de uma nova espécie em um ambiente não ocupado, para o controle de determinado organismo adventício, reestruturando assim este ambiente (Flint *et al.*, 1998).

A dispersão de pragas resistentes a múltiplos pesticidas é uma das maiores preocupações de produtores rurais e órgãos públicos, nos dias de hoje. O uso indiscriminado de pesticidas, além de danoso ao meio-ambiente, tem acelerado o surgimento de pragas multirresistentes, como a lagarta *Helicoverpa armigera* (Alvi *et al.*, 2012; Tay *et al.*, 2013) e o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Abbas *et al.*, 2014). Em 2013, um surto de uma linhagem de *H. armigera* multirresistente, obrigou municípios brasileiros a decretarem estado de emergência fitossanitário, permitindo o uso de inseticidas ainda não registrados no Brasil. Tais lagartas, que possuem um amplo espectro de plantas-alvo, tem motivado a adoção de diversas práticas e, tem sido alvo de intenso estudo pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)(Embrapa, 2013).

O carrapato bovino *R. microplus* é dos maiores problemas para pecuaristas de regiões tropicais e subtropicais. Seu parasitismo reduz o ganho de peso, podendo levar a anemia e a transmissão de agentes causativos da febre do carrapato, causando danos ao couro do animal, entre outros problemas (Seixas *et al.*, 2012). No início de 2014, pesquisadores relataram, pela primeira vez, o isolamento de carrapatos resistentes a benzoil fenil ureia, o único dos acaricidas indicados para o controle de carrapato no Brasil que ainda não possuía populações resistentes, tal linhagem foi denominada Jaguar (Reck *et al.*, 2014).

A utilização de inimigos naturais como controladores biológicos é uma alternativa ambientalmente menos impactante que pode ser utilizado em programas de manejo, para controlar pragas resistentes e não resistentes (Peshin e Dhawan,

2009). Por exemplo, o uso de baculovírus, um vírus que naturalmente infecta artrópodes, tem se mostrado efetivo no controle de *H. armigera* (Rowley, Popham e Harrison, 2011) e formulações de fungos entomopatogênicos para o controle da linhagem Jaguar do carrapato bovino estão em desenvolvimento (Webster, comunicação pessoal). O uso de controladores biológicos também tem se mostrado uma alternativa, a fim de contornar a dispersão, e surgimento de insetos resistentes a plantas transgênicas (Liu *et al.*, 2014). Com outros relatos na literatura em que a aplicação de tecnologias que envolvem controladores biológicos foram bem-sucedidas (Cory e Franklin, 2012).

1.2 *Metarhizium anisopliae*

1.2.1 Características e Taxonomia do Gênero *Metarhizium*

Metarhizium anisopliae (Hypocreales: *Clavicipitaceae*) é a principal espécie do gênero de fungos entomopatogênicos *Metarhizium*. Isolado pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff o gênero foi estabelecido por Sorokin em 1883. O fungo é distinguido por apresentar micélio hialino e septado, dotado de conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos esverdeados, organizados em colunas (Figura 1) (Zimmermann, 2007).

Atualmente quarenta e duas entradas estão listadas para membros do gênero *Metarhizium* na *Index Fungorum* (Crous *et al.*, 2004). Embora nem todas as espécies listadas sejam reconhecidas, a filogenia do gênero tem sido alvo de grandes reformulações nos últimos anos. A primeira revisão do gênero, baseada em características morfológicas, foi realizada por Tulloch em 1976 (Tulloch, 1976). Em seu trabalho ele distinguiu duas espécies, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*. Em 1994, outra tentativa de classificação, baseada em características morfológicas e coloração dos conídios, propoz três espécies: *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album*, com duas variedades *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* var. *flavoviride* (Curran *et al.*, 1994). Em 2000, pela primeira vez abordagens moleculares foram usadas na tentativa de descrever o gênero, utilizando sequências de ITS (*internal transcribed spacers*). Tal análise levou a manutenção das espécies já descritas, porém acrescentou mais duas variedades a *M. anisopliae* e cinco a *M. flavoviride* (Driver, Milner e Trueman, 2000). Até então só a fase anamorfa do fungo havia sido identificada. Em 2001, mediante a comparação de sequências ITS de *Metarhizium*

spp. e *Cordyceps spp.*, foi identificado a espécie *Cordyceps brittlebankisoides* como a forma teleomórfica de *M. anisopliae* var. *majus*, e com isso o gênero *Metarhizium* passou a integrar o filo Ascomycota. Esses resultados foram suportados por trabalhos subsequentes, sendo a fase sexual de *Metarhizium* pertencente ao gênero *Metacordyceps*, uma discriminação possível na filogenia de fungos (Liu *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2007).

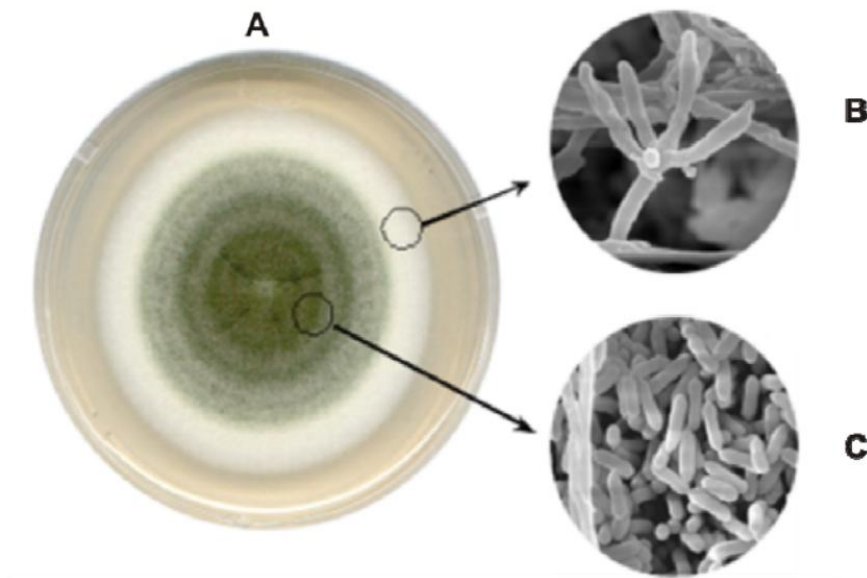


Figura 1: Aspecto morfológico da linhagem E6 de *M. anisopliae*. (A) Colônia em Meio de Cove Completo (MCc). (B) Do micélio hialino emergem os conidióforos que darão origem aos conídios de coloração verde-musgo (C). Imagem de autoria de (Arruda *et al.*, 2005).

Em 2009 uma nova análise, utilizando um número maior de marcadores moleculares, discriminou que o gênero é composto por 12 espécies (*M. anisopliae*; *M. acridum*; *M. brunneum*; *M. globosum*; *M. guizhouense*; *M. lepidiotae*; *M. majus*; *M. pinghaense*; *M. robertsii*; *M. album*; *M. flavoviride*; *M. frigidum*) (Bischoff, Rehner e Humber, 2006; 2009). O trabalho também evidenciou a impossibilidade em discriminar espécies crípticas utilizando ITS como marcador no gênero *Metarhizium* e aconselhou o uso do EF-1 α (*elongation factor 1-alpha*). Este trabalho foi apoiado por trabalhos posteriores (Kepler e Rehner, 2013).

Embora o trabalho de Bischoff e colaboradores (2009) seja considerado um marco definitivo nas diversas tentativas de discriminar corretamente o gênero *Metarhizium*, tal divisão pode ainda não refletir a grande biodiversidade existente. Uma das características mais notáveis do gênero é a grande variação (i.e. virulência

a diferentes artrópodes, taxa de crescimento e esporulação, capacidade de utilizar diferentes nutrientes, produção de toxinas) existente (Hu *et al.*, 2006; Zimmermann, 2007; Lubeck *et al.*, 2008; Schrank e Vainstein, 2010; Nishi *et al.*, 2013) (Figura 2). Tais diferenças podem indicar um maior número de espécies crípticas ainda não identificadas.

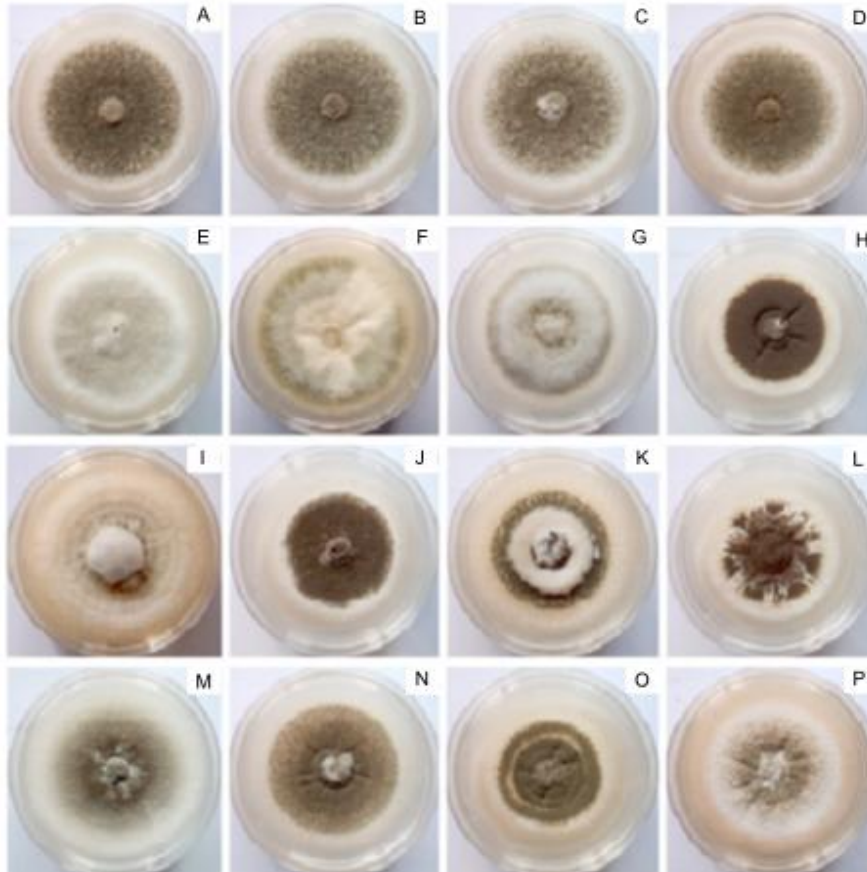


Figura 2: Diferenças morfológicas entre linhagens de *M. anisopliae*. (A) AL; (B) M5; (C) MT; (D) E6; (E) E9; (F) Rjd; (G) Nordeste; (H) CARO7; (I) CARO11; (J) CARO12; (K) CARO14; (L) CARO19; (M) CG27; (N) CG30; (O) CG31; (P) CG33. Modificado de (Schrank e Vainstein, 2010).

1.2.2 Interação *Metarhizium*-Hospedeiro

A interação entre *M. anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes é um processo complexo, consistindo de diversas etapas (Figura 3). Entender detalhadamente estas etapas, e proteínas envolvidas, é um dos alvos de estudo em fungos entomopatogênicos (Zimmermann, 2007; Schrank e Vainstein, 2010).

Embora existam descrições na literatura de infecção pós-ingestão, essa não parece ser uma via comum de infecção na maioria dos hospedeiros de *M. anisopliae*, sendo a carapaça a via de entrada preferencial (Figura 4) (Leemon e Jonsson, 2012; Boomsma *et al.*, 2014). A adesão do conídio a superfície do

hospedeiro, sua germinação e posterior penetração são etapas chave no processo de infecção. Interações hidrofóbicas entre proteínas que recobrem o conídio e a camada lipídica dos artrópodes, e proteínas como hidrofobinas e adesinas desempenham um papel essencial no processo de adesão (Wang e St Leger, 2007; Sevim *et al.*, 2012). Além disso, a presença de aminoácidos livres, peptídeos e outras substâncias podem desencadear a adesão e a germinação (Zimmermann, 2007). As lipases produzidas pelo fungo, também parecem desempenhar um papel essencial no processo de adesão e germinação dos conídios (Gindin *et al.*, 2009; Santi *et al.*, 2010). Uma vez que o tratamento de *M. anisopliae* com um inibidor de lipases, preveniu a infecção no carrapato bovino *R. microplus* (Da Silva *et al.*, 2010).

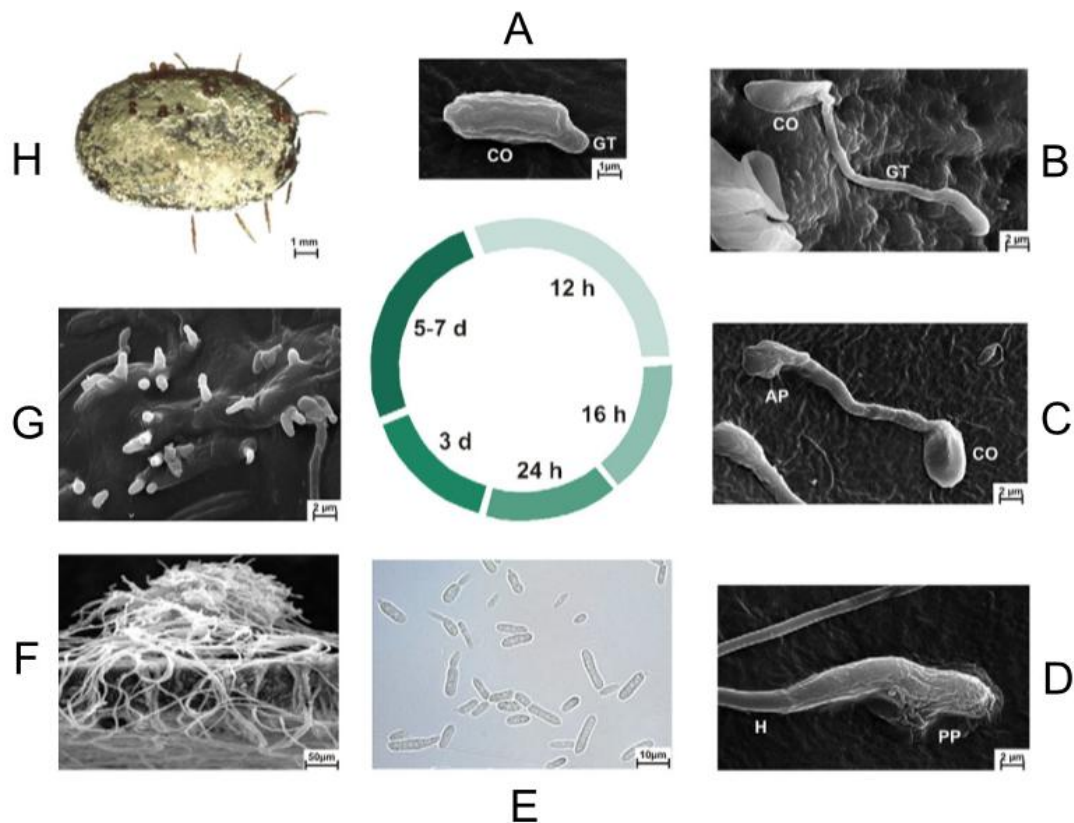


Figura 3: Ciclo infeccioso de *M. anisopliae*. (A, B, C) Adesão do conídio a superfície do hospedeiro, germinação e diferenciação em apressório; (D) Penetração; (E) Blastosporos na hemolinfa do artrópode; (F) Colonização; (G) Extrusão das hifas do cadáver do inseto; (H) Conídios e conidióforos sobre a superfície do cadáver. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP- apressório, H- hifa, PP- penetração. Modificado de (Schrank e Vainstein, 2010).

A germinação do conídio e posterior formação do apressório para a penetração são etapas metabolicamente ativas, onde o fungo deve utilizar reservas endógenas para o seu crescimento (Ment *et al.*, 2012). O apressório, uma estrutura de penetração especializada, conservada em fungos entomopatogênicos e

fitopatogênicos, diferencia-se a partir de uma das extremidades da hifa germinada. Essa estrutura combina pressão mecânica e a secreção de diversas enzimas hidrolíticas para romper a cutícula (Schrank e Vainstein, 2010). Dentre as enzimas secretadas para a degradação de componentes da cutícula estão proteases, esterases, lipases, quitinases, aminopeptidases, dipeptidil peptidinas, tripsina, entre outras. Algumas dessas enzimas são determinantes para o sucesso da infecção (Zimmermann, 2007). As subtilisinas da família Pr1 e quitinases, por exemplo, têm sido alvo de diversos estudos como importantes fatores de virulência (St Leger *et al.*, 1996; St Leger, Joshi e Roberts, 1998; Bagga *et al.*, 2004).

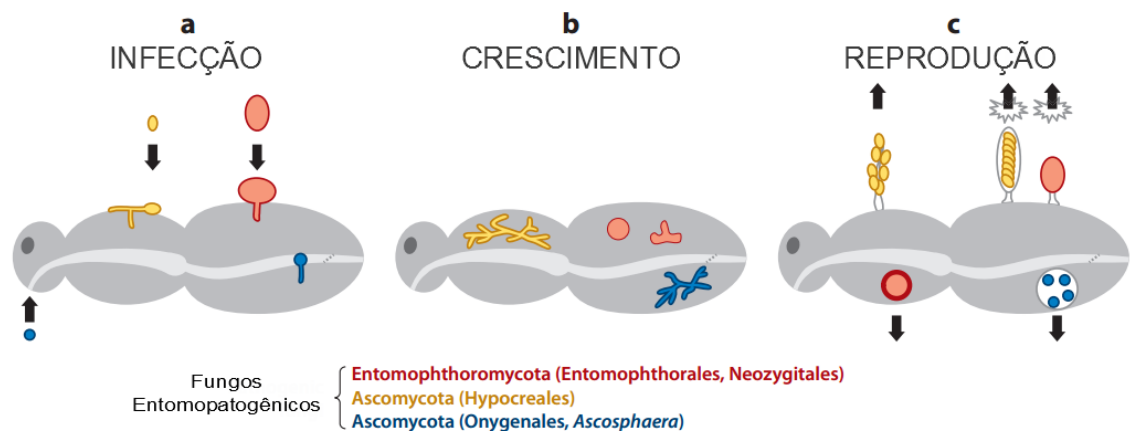


Figura 4: Vias de infecção, crescimento e reprodução de diferentes fungos entomopatogênicos. (a) Enquanto fungos das ordens Entomophthorales, Neozygitales e Hypocreales iniciam sua infecção através da carapaça, fungos da ordem Onygenales desenvolvem a infecção pós-ingestão de conídios pelo hospedeiro. **(b)** Crescimento de hifas, pós-penetração. **(c)** Liberação de conídios no ambiente. Modificado de (Boomsma *et al.*, 2014).

Uma vez que as hifas do fungo conseguem atravessar a carapaça, *M. anisopliae* se diferencia em uma estrutura unicelular, conhecida como blastosporo, uma forma celular leveduriforme (Schrank e Vainstein, 2010). Esses blastosporos são importantes na evasão da resposta imune, aquisição de nutrientes, colonização e morte, sendo dispersos passivamente dentro do hospedeiro (Clarkson e Charnley, 1996; Wang e St Leger, 2007; Zhang e Xia, 2009).

Na hemolinfa o fungo também produz diversos metabólitos secundários (Roberts, 1969; Zimmermann, 2007). As destruxinas são o principal metabólito produzido por *M. anisopliae*, apresentando diferentes níveis de toxicidade aos hospedeiros (Wang, Skrobek e Butt, 2004; Skrobek e Butt, 2005; Pal, Leger e Wu, 2007). Esses depsipeptídeos são divididos em seis classes principais: A, B, C, D, E

e desmetil destruxina B. Liu e colaboradores (2004b) identificaram mais de 35 tipos de destruxinas apenas em fungos do gênero *Metarhizium*. Esse perfil de metabólitos secundários produzidos é variável conforme a linhagem analisada. Tal variação afeta diretamente a virulência e o sucesso da infecção (Liu, Huang e Tzeng, 2004a; b).

A hemolinfa dos insetos também é rica em trealose, um dissacarídeo de difícil assimilação (Barraza e Sánchez, 2013). O gene *Mpk1*, cujo produto funcional é uma fosfocetolase envolvida na via das pentoses, importante para a assimilação da trealose do hospedeiro, foi adquirida via transferência horizontal gênica (THG) em *M. anisopliae* (Duan *et al.*, 2009). Recentemente, um estudo com o gene *Mr-npc2a* de *M. roberstii*, envolvido em rotas de assimilação de esterol do hospedeiro, mostrou que esse gene também foi adquirido por THG, via inseto-fungo. O produto funcional deste gene liga-se preferencialmente ao esterol do inseto, facilitando sua assimilação, não se ligando ao esterol fúngico. A deleção deste gene reduziu a quantidade de esterol nos blastosporos, sendo estes mais suscetíveis à resposta imune do hospedeiro (Zhao *et al.*, 2014). Esses eventos de THG que aconteceram durante a evolução de fungos do gênero *Metarhizium* são de vital importância na patogênese e assimilação de nutrientes do hospedeiros.

Uma vez na hemolinfa o período de incubação e morte do inseto é variável. Quando exauridos os nutrientes do hospedeiro, o fungo começa a crescer sobre o artrópode, com a mumificação do cadáver, e produção de conídios que serão liberados no ambiente (Zimmermann, 2007).

Outro fator importante para o sucesso da infecção é a resposta imune do artrópode, cujo tema tem levantado interesse de diversos grupos de pesquisa. (Vilcinskas, 2010; 2013). Os artrópodes são os animais mais bem sucedidos na terra em termos de diversidade de espécies. Seu sucesso evolutivo se deve, em muito, a sua capacidade de adaptação a ambientes inóspitos, patógenos e parasitas (Vilcinskas, 2010; Evans e Schwarz, 2011; Vilcinskas, 2013). A resistência de hospedeiros a fungos entomopatogênicos já foi descrita por alguns pesquisadores (Broza, Pereira e Stimac, 2001; Gindin *et al.*, 2002; Kirkland, Cho e Keyhani, 2004; Vilcinskas, 2010; 2013). Essa resistência pode ser o resultado de diversos fatores, atuando de forma sinérgica, ou separadamente. Acredita-se que alterações

comportamentais em resposta a infecção podem contribuir para a resistência a fungos micopatogênicos, sendo esta resposta observada em diversas ordens de insetos. Práticas de higienização do ninho e de indivíduos são um exemplo bastante conhecido, observado em formigas (Yanagawa, Yokohari e Shimizu, 2008; Tragust *et al.*, 2013). A febre comportamental é também uma alteração bastante comum. Definida como uma alteração aguda nas preferências térmicas do hospedeiro em resposta ao reconhecimento do patógeno, essa alteração tem sido relatada em diversos invertebrados e vertebrados ectotérmicos, podendo favorecer a resposta imune e dificultar o crescimento do patógeno (Boltana *et al.*, 2013). Em gafanhotos infectados, temperaturas corpóreas superiores a 44°C já foram observadas. Esta elevada temperatura é inibitória ao crescimento da maioria das linhagens de *M. anisopliae* (Inglis *et al.*, 1997; Ouedraogo *et al.*, 2003; Arruda, 2005; Elliot *et al.*, 2005). Outra forma de defesa é a carapaça. Além de uma barreira física, essa estrutura também pode atuar como uma barreira química. Apresentando composições variáveis, mesmo entre artrópodes da mesma espécie (Pedrini, Crespo e Juarez, 2007), a superfície do hospedeiro pode estar recoberta com compostos tóxicos, inibindo a germinação da hifa, ou ser deficiente em nutrientes que suportem o desenvolvimento do fungo (Butt *et al.*, 1992; Wang e St. Leger, 2005; Pedrini, Crespo e Juarez, 2007; Golebiowski *et al.*, 2008; Ment *et al.*, 2012; Ment *et al.*, 2013). A resistência pode ser também adquirida devido a respostas imunes do hospedeiro durante, e após, a penetração. A melanização, uma resposta imune primitiva que não está presente em todos os hospedeiros, consiste na hidroxilação de fenóis e o-fenóis, resultando na formação de melanina a partir de quinonas. Durante este processo, espécies reativas de oxigênio são geradas, sendo tóxicas tanto para o fungo como para o hospedeiro (Ment *et al.*, 2012). A melanização ocorre na endocutícula de zonas de penetração, e tem por objetivo interromper o crescimento do fungo e evitar que ele atinja a hemolinfa, sendo uma importante forma de defesa em insetos como *Galleria melonella* (Gunnarsson, 1988; Chouvenec, Su e Robert, 2009; 2011; Ment *et al.*, 2012). Uma vez que a penetração é bem-sucedida, o fungo deve encontrar meios de escapar da encapsulação por hemócitos, células fagocitárias de invertebrados (Bogus *et al.*, 2007; Ebrahimi, Niknam e Dunphy, 2011). No entanto, em muitos casos, uma vez que a penetração ocorreu o hospedeiro não consegue resistir à infecção.

1.3 Glicosil Hidrolases

Glicosil hidrolases (GH EC 3.2.1.-) são um grupo diverso de enzimas, presentes em eucariotos, protistas e alguns vírus. Tais enzimas, de importância fundamental no metabolismo de carboidratos, hidrolisam ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e um não carboidrato (Naumoff, 2011). O número e diversidade de GHs presentes em determinado organismo é dependente do seu nicho ecológico. Estes genes estão sujeitos, com frequência, a duplicações, deleções e transferência horizontal (Naumoff, 2011).

A diversidade de substratos: di-, oligo- e polissacarídeos, assim como seus derivados, refletem na diversidade de enzimas presentes neste grupo genérico. A nomenclatura destas enzimas é baseada, principalmente, na especificidade ao substrato principal (i.e. amilases EC 3.2.1.1 hidrolisam amido) e, algumas vezes, em seu mecanismo de ação. De maneira geral, todas as enzimas GH, possuem mais de um substrato, refletindo em algumas confusões na classificação das enzimas. Frequentemente, essas enzimas também possuem atividade de transglicosidase (EC. 2.4.1.-) concomitantemente com a atividade de glicosidase. Enzimas com tal característica podem ser classificadas em duas classes, transferases e hidrolases (Yin *et al.*, 2009; Naumoff, 2011). Atualmente estão listadas no CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes <http://www.cazy.org/>) 128 famílias GH, sendo está subdivisão baseada em similaridade de aminoácidos do sitio catalítico (Cantarel *et al.*, 2009).

1.3.1 Quitinases

Fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* apresentam um grande número de GHs. Durante o processo de infecção dos hospedeiros, tais enzimas são importantes na penetração, colonização e extrusão do fungo. Em conjunto com lipases e proteases, as quitinases (EC 3.2.1.14) possuem um papel fundamental na infecção e no ciclo de vida do fungo (Schrank e Vainstein, 2010).

Quitina e celulose são os dois polímeros naturais mais abundantes no ambiente. A quitina consiste em ligações β -1,4 entre monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) formando um homopolímero linear, constituinte mais abundante da parede celular de fungos filamentosos e do exoesqueleto de artrópodes. Ocorrendo na natureza em três formas, α , β e γ , a forma dominante, α -

quitina, consiste em cadeias lineares de GlcNAc organizadas de maneira antiparalela, sendo encontrada no exoesqueleto de crustáceos. A β -quitina é composta de cadeias organizadas de maneira paralela, como observado na concha interna de lulas, e a γ -quitina consiste de duas cadeiras paralelas alternadas com uma cadeia antiparalela, sendo encontrada em fungos (Jang *et al.*, 2004; Adrangi e Faramarzi, 2013).

O mecanismo de degradação enzimática de quitina é complexo, envolvendo um conjunto de enzimas (Figura 5) (Duo-Chuan, 2006). Embora a quitina esteja presente de maneira ubíqua em diversos ambientes, principalmente marinhos, pouco pode ser encontrado em sedimentos, demonstrando a eficiência de fungos e bactérias na degradação de tal polímero (Howard *et al.*, 2003). Em geral o primeiro passo no processo de degradação envolve a ação de quitinases. As quitinases podem ser divididas em endo- e exoquitinases, com enzimas com ambas as atividades já descritas (Da Silva *et al.*, 2005). Exoquitinases hidrolisam a quitina, geralmente, a partir de sua extremidade não redutora, liberando dímeros de GlcNAc. Endoquitinases clivam o homopolímero de quitina em sítios internos aleatórios, liberando multímeros solúveis de GlcNAc como quitotetraose, quitotriose e quitobiose (Duo-Chuan, 2006). Os compostos gerados em decorrência da ação das quitinases são então hidrolisados por quitodextrinases (EC 3.2.1.14) e N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.52), formando monômeros de GlcNAc e quitobiose, que serão usados na biogênese da parede celular ou como fonte de nutrientes. A quitina pode ser também deacetilada por quitina deacetilases (EC 3.5.1.41) formando quitosana, uma forma solúvel em água. A quitosana pode ser degradada por quitosanases (EC 3.2.1.132) e também metabolizada (Figura 5) (Howard *et al.*, 2003; Duo-Chuan, 2006).

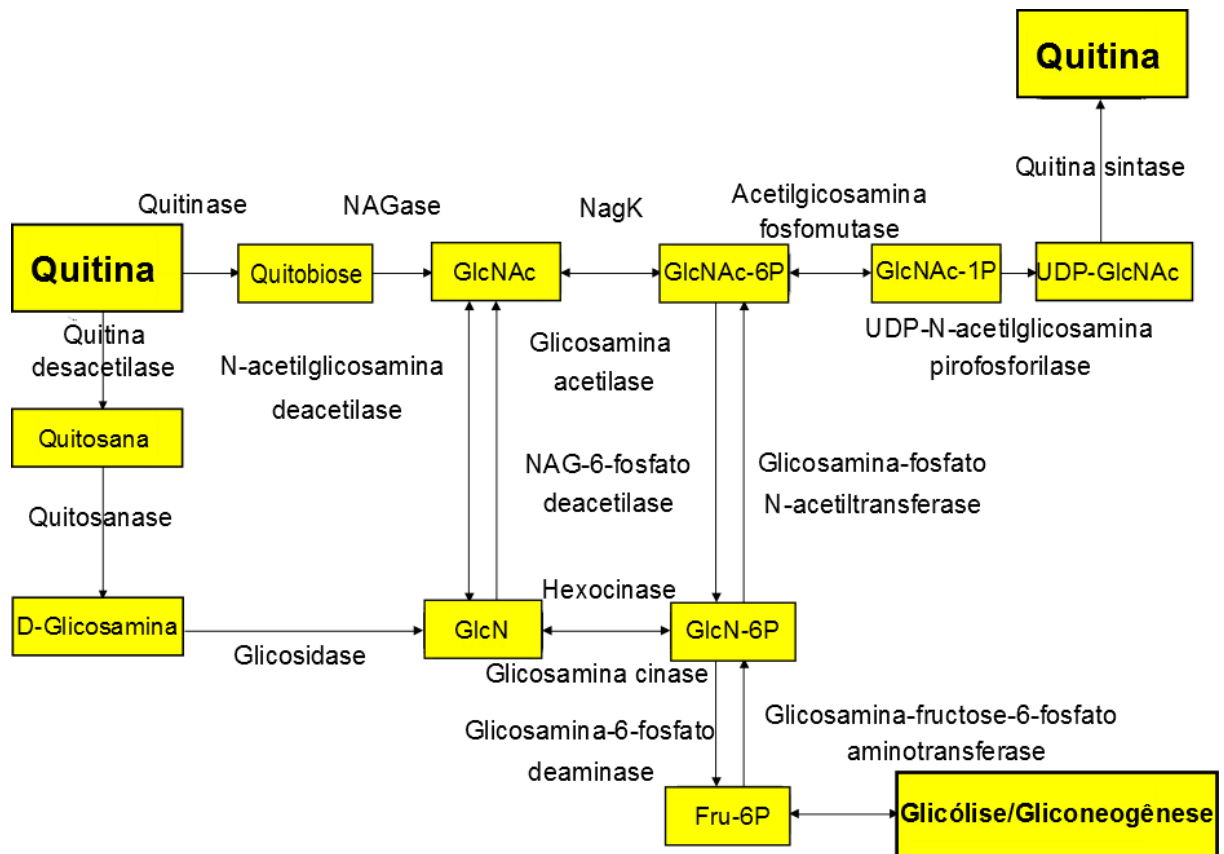


Figura 5: Vias catabólicas e anabólicas da quitina em fungos filamentosos. Os monômeros de GlcNAc gerados a partir da quebra do polímero de quitina podem ser usados tanto na Glicólise/Gliconeogênese, como para síntese de quitina da parede celular (Howard *et al.*, 2003; Duo-Chuan, 2006; Merzendorfer, 2011; Gruber e Seidl-Seiboth, 2012; Chavan e Deshpande, 2013).

Quitinases são produzidas por um vasto número de organismos como vírus, bactérias, fungos, plantas e animais, para diferentes propósitos como nutrição, morfogênese e defesa contra patógenos (Schrank e Vainstein, 2010; Adrangi e Faramarzi, 2013). Quitinases são encontradas nas famílias GH18, GH19, GH23 e GH48, sendo as famílias GH18 e GH19 as mais bem estudadas. As quitinases da família GH18 se distribuem de forma ubíqua em Procariotos e Eucariotos. O domínio GH18, o qual caracteriza a família, contém os motivos conservados DxxDxDxE e S/AxGG e enovela-se formando o barril TIM ($(\beta/\alpha)_8$ *barrel*), uma estrutura proteica conservada que consiste de oito α -hélices e oito folhas- β (Seidl *et al.*, 2005). Adicionalmente, as quitinases podem conter outros domínios, como domínios de ligação a carboidrato (CBM), que auxiliam no ancoramento da enzima, aumentando assim sua atividade, domínios LysM e domínios ricos em Serina/Treonina (Adrangi e Faramarzi, 2013).

Em fungos, até o presente momento, só foram descritas quitinases da família GH18. O número de genes desta família por espécie é bastante variável. Enquanto apenas um único gene é encontrado na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, mais de 36 foram relatados no fungo filamentoso *Trichoderma viriens* (Gruber e Seidl-Seiboth, 2012). As expansões e contrações no número de genes desta família, nos diferentes organismos, seguem um padrão não aleatório (Karlsson e Stenlid, 2008). Atualmente as quitinases de fungos podem ser divididas em três subgrupos (A, B e C) seguindo a classificação proposta para o fungo *Hypocrea jericona*, baseada em similaridade de sequências e organização de domínios (Seidl *et al.*, 2005). As quitinases do subgrupo A caracterizam-se por apresentar um único domínio catalítico, não apresentando CBMs (Adrangi e Faramarzi, 2013). Em *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.* foi proposto que enzimas desse subgrupo estariam envolvidas em processos de autólise (Pocsi *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009). O subgrupo B caracteriza-se por apresentar domínios adicionais, além do GH18, como CBMs e domínios ricos em Serina/Treonina (Adrangi e Faramarzi, 2013). Mutantes quintuplos, onde todos os membros desse subgrupo foram deletados em *Aspergillus nidulans*, não apresentaram defeitos severos no crescimento e na germinação, indicando uma possível função nutricional (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Os únicos mutantes de quitinases em *M. anisopliae*, os genes *chi2* (*ChimaB1*) e *chi3* (*ChimaB2*), quando deletados, afetaram negativamente o processo de infecção, corroborando com a hipótese atual (Boldo *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2013). O subgrupo C caracteriza-se por apresentar genes maiores que os demais, sendo o subgrupo menos estudado (Junges, 2010). Uma das características desse subgrupo, é a presença de diversos domínios LysM (CMB 50), os quais foram primeiro identificados em bactérias e bacteriófagos, como domínios de ligação a peptidoglicana (Bateman e Bycroft, 2000). Posteriormente foi mostrado que esses domínios são capazes de ligar outras glicanas, como quitina (Buist *et al.*, 2008). Embora tenha sido alvo de recentes trabalhos, a função exata das quitinases do subgrupo C permanece incerta e especulativa (Tzelepis, G. D. *et al.*, 2014). De maneira geral a caracterização da família GH18 em fungos tem se mostrado desafiadora, dado o grande número de genes e possíveis funções compensatórias exercidas.

1.3.2 ENGases

Endo- β -D-N-acetilglicosaminidases (ENGases) (EC 3.2.1.96) são enzimas encontradas nas famílias GH18, 73 e 85, sendo os representantes da família GH18 os únicos descritos em fungos filamentosos. Essas enzimas, assim como as quitinases, são responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 entre monômeros de GlcNAc. Embora ambas catalisem a mesma reação, elas diferem em relação ao tipo de substrato utilizado. Enquanto as quitinases hidrolisam homopolímeros de GlcNAc, as ENGases de fungos atuam sobre oligossacarídeos de proteínas N-glicosiladas, em um processo de deglicosilação (Figura 6) (Stals *et al.*, 2012).

As ENGases da família GH18 estão, atualmente, melhor descritas em Procariotos. Endo H oriunda de *Streptomyces plicatus* é o representante mais conhecido, possuindo aplicações no ramo da glicoproteômica (Medzihradzsky, 2005). Outros representantes como Endo F1, F2 e F3 de *Elizabethkingia meningoseptica* e Endo S oriunda de *Streptococcus pyogenes*, também já foram caracterizados, com estruturas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Nessas bactérias, a atividade de deglicosilação é postulada como um importante fator de virulência, podendo, por exemplo, deglicosilar a imunoglobulina humana (Renzi *et al.*, 2011; Sjogren *et al.*, 2013). Porém, nem todas as bactérias patogênicas parecem se utilizar deste mecanismo. *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são duas bactérias patogênicas responsáveis por 95% dos casos de infecção enterocócica. Enquanto *E. faecalis* apresenta atividade de deglicosilação, *E. faecium* não possui (Roberts *et al.*, 2001). Yu e colaboradores (2014) demonstraram que a capacidade de deglicosilação de Endo S, utilizada por *S. pyogenes* para combater a defesa humoral, poderia ser utilizada como um imunomodulador, com aplicações terapêuticas no combate de doenças autoimunes dependentes de anticorpos (Yu *et al.*, 2014). Endo BI-1, da bactéria probiótica *Bifidobacterium infantis*, uma das primeiras bactérias a ocupar a microbiota intestinal de recém-nascidos, tem a capacidade de deglicosilar N-glicanas complexas oriundas do leite materno (Garrido *et al.*, 2012). Atividades de transglicosilação também já foram relatadas em diversas ENGases bacterianas da família GH18, sendo consideradas enzimas com dupla função (Lomino *et al.*, 2013).

Algumas ENGases da família GH85 já foram caracterizadas, como Endo M de *Mucor hiemalis*. Esta enzima é utilizada na síntese de neoglicopeptídeos e glicoconjugados, dado a sua atividade de transglicosilação, em conjunto com atividade de deglicosilação (Umekawa *et al.*, 2008; Hojo *et al.*, 2012). Outras enzimas desta família como Endo A de *Arthrobacter protophormiae* e Endo-Om da levedura *Ogataea minuta* também já foram descritas, sendo a atividade de glicosilação de Endo A de grande interesse (Heidecke, Parsons e Fairbanks, 2009; Murakami *et al.*, 2013). Análises *in silico* indicam que outras leveduras (*Candida parapolymorpha*, *Pichia anomala* e *Zygosaccharomyces rouxii*) também possuem ENGases da família GH85, porém leveduras modelo como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* não apresentam (Murakami *et al.*, 2013). Ortólogos da família GH85 também já foram descritos na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, no nematódeo modelo *Caenorhabditis elegans*, assim como em humanos. Nestes organismos, as ENGases estão envolvidas em rotas de degradação de proteínas mal formadas (ERAD: *Endoplasmic-reticulum associated protein degradation*) (Suzuki *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2011).

As ENGases da família GH73 são as menos estudadas. Essas enzimas atuam na hidrólise de peptídeoglicana, constituinte da parede celular bacteriana, a qual contém GlcNAc (Inagaki *et al.*, 2009; Ronholm *et al.*, 2012).

Em fungos do gênero *Trichoderma* um único monômero de GlcNAc ligado a celulases secretadas pelo fungo foi alvo de intenso estudo, intrigando diversos grupos de pesquisa durante anos (Klarskov *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1998; Stals *et al.*, 2004). Esse monômero único indicava a presença de uma enzima com atividade de endoglicosidase, que em 2010 foi purificada por Stals e colaboradores. A enzima, denominada Endo T, foi identificada como uma ENGase da família GH18, a primeira ENGase desta família a ser descrita em fungos. Esta enzima, que não possui atividade quitinolítica, hidrolisa ligações β -1,4 entre monômeros de GlcNAc de N-oligosacarídeos ricos em manose (Stals *et al.*, 2010). Com ortólogos e atividade de endoglicosidase comprovada em outros fungos, essas enzimas apresentam baixa identidade de sequências com as ENGases bacterianas da família GH18 (embora apresentem uma estrutura proteica bastante similar). Esta baixa identidade impossibilitou sua descoberta em análises *in silico*, por simples comparação de similaridade com ENGases bacterianas. Explicando assim a demora

em identificar as ENGases da família GH18 em fungos (Stals *et al.*, 2012; Tzelepis *et al.*, 2012; Tzelepis, G. *et al.*, 2014). Embora atue deglicosilando celulases, não há correlações entre a expressão destas duas enzimas, indicando, que mais proteínas N-glicosiladas podem sofrer deglicosilação. Endo T, que é secretada, pode também atuar deglicosilando proteínas do hospedeiro na captação de nutrientes, porém ainda é incerto se a deglicosilação de proteínas próprias ocorre no meio intra ou extracelular. Estudos posteriores demonstraram que as ENGases fúngicas são, muito provavelmente, uma neofuncionalização das quitinases da família GH18. Um mutante funcional, onde a produção de Endo T foi abolida, interrompendo o gene *Eng18A*, comprovou que a deglicosilação observada nas celulases, era fruto da ação desta enzima (Stals *et al.*, 2012). Hamaguchi e colaboradores descreveram outra ENGase da família GH18 no fungo *Flammulina velutipes* (Endo FV), essa enzima, que estava presente em duas formas em extratos purificados do fungo, também possui atividade de transglicosilação (Hamaguchi *et al.*, 2010). A deleção do gene *Eng18B*, o qual produz uma ENGase com atividade citosólica, afetou negativamente o crescimento e a atividade antagonística do fungo *Trichoderma atroviride*, sendo uma hipótese a atuação dessa proteína citosólica no ERAD (Dubey *et al.*, 2012). A deleção do gene *gh18-10*, ortólogo de *Eng18B*, no fungo *Neurospora crassa* alterou negativamente a taxa de crescimento, e positivamente a conidiação e resistência ao estresse abiótico da linhagem mutante, quando comparada com a linhagem selvagem. Além disso, tal mutante apresentou uma baixa secreção de proteínas extracelulares e redução da atividade de proteases (Tzelepis *et al.*, 2012). As ENGases de fungos também estão levantando interesse em áreas como a glicômica, proteômica e processos biofarmacêuticos, com possíveis aplicações comerciais (Gerlach *et al.*, 2012).

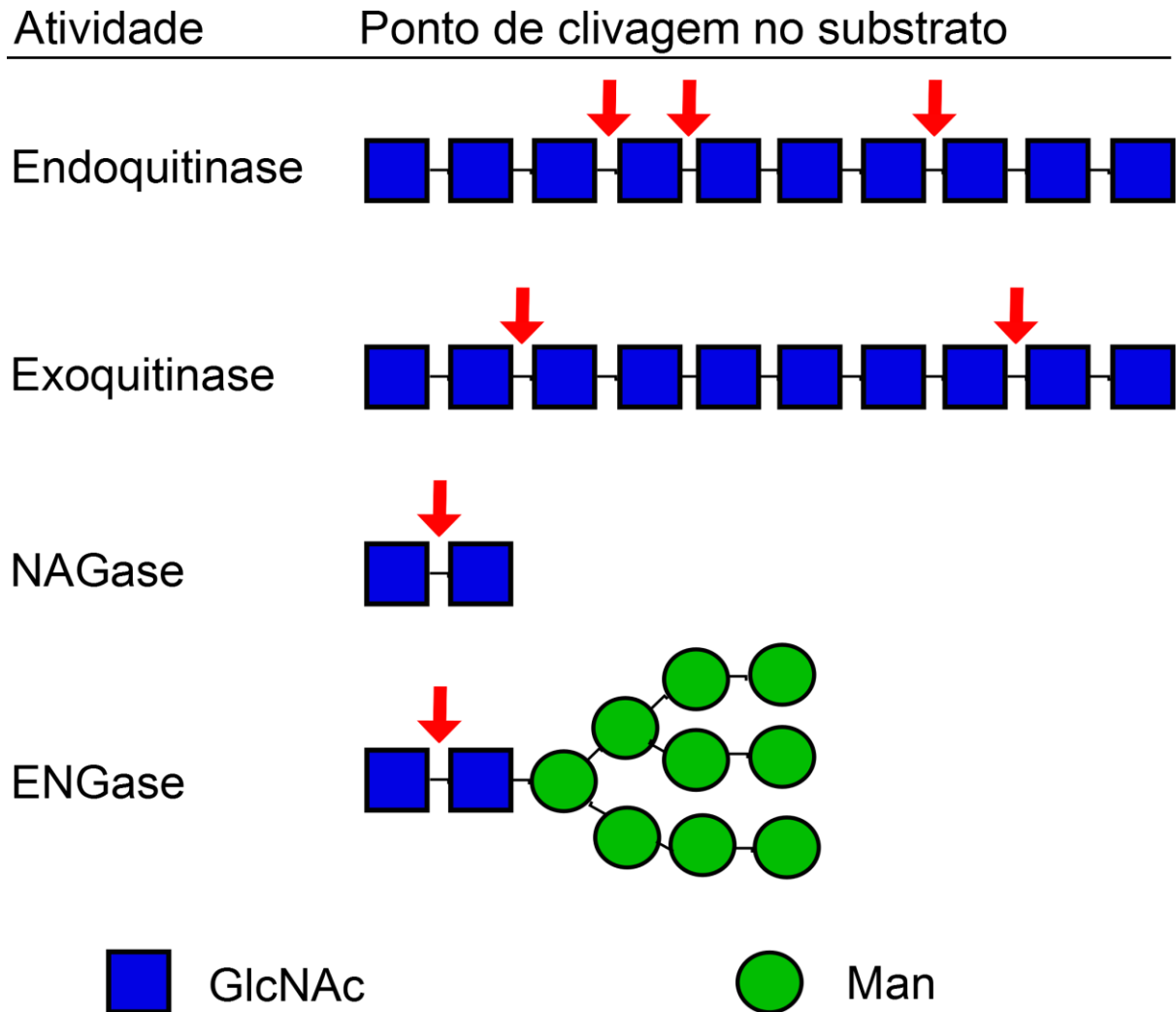


Figura 6: Modo de ação de ENGases e de enzimas envolvidas no catabolismo de quitina. Em azul monômeros de GlcNAc, em verde monômeros de manose, setas vermelhas indicam o ponto de clivagem no substrato. A maioria dos fungos filamentosos, com exceção de *M. anisopliae* e *M. robertsii* possuem uma ENGase putativa secretada e outra cópia com possível atividade citosólica (Duo-Chuan, 2006; Stals *et al.*, 2010; Chavan e Deshpande, 2013). Representação de monossacarídeos segundo (Harvey *et al.*, 2009; Varki *et al.*, 2009).

1.3.3 Família GH18 em *M. anisopliae*

Uma análise genômica da linhagem E6 de *M. anisopliae*, realizada em nosso laboratório, identificou vinte e quatro genes putativos contendo o domínio GH18 (Figura 7) (Junges, 2010). Quando comparamos o número de genes desta família com *M. robertsii*, um fungo generalista em relação aos seus hospedeiros (assim como *M. anisopliae*), e *M. acridum*, um fungo hospedeiro-específico (Gao *et al.*, 2011) podemos notar que a linhagem E6 apresenta um número intermediário de genes (Figura 8). Trabalhos de nosso grupo mostram que o número de genes da família GH18 pode variar, não apenas entre espécies próximas, como também há

variações consideráveis entre linhagens da mesma espécie (Sbaraini, dados não publicados).



Figura 7: Os vinte e quatro genes da família GH18 de *M. anisopliae*, domínios e características funcionais. Sequências codificadoras estão identificadas como caixas, íntrons como traços. Nós classificamos os vinte e quatro genes putativos em cinco subgrupos, baseado em similaridade de sequências, relações filogenéticas, presença de domínios e características funcionais. Com nove genes agrupados no subgrupo A, sete genes no B, quatro genes no C, um gene no subgrupo D e três genes a um subgrupo contendo ENGases. Modificado de (Junges *et al.*, submetido).

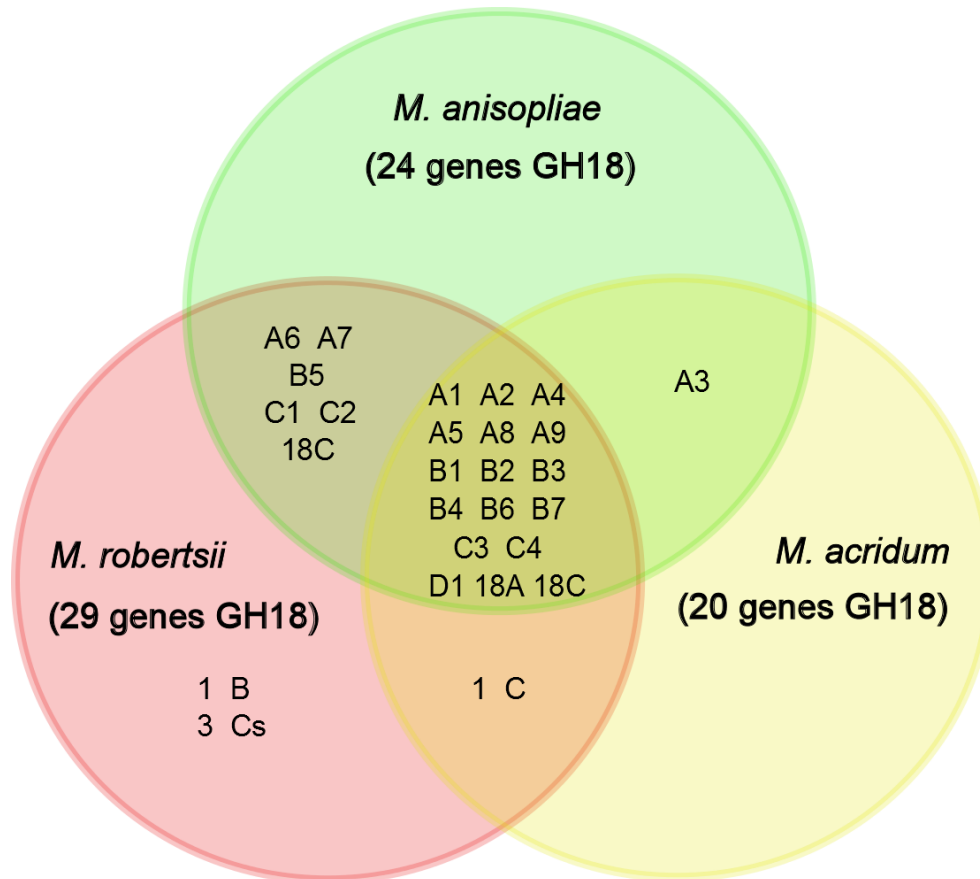


Figura 8: Diagrama de Venn demonstrando a comparação do número de genes da família GH18 entre espécies do gênero *Metarhizium*. Enquanto *M. anisopliae* possui 24 genes da família GH18, *M. robertsii*, um fungo hospedeiro-generalista possui 29, apresentando 4 quitinases do subgrupo C e uma quitina do subgrupo B a mais que *M. anisopliae*. *M. acridum* um fungo hospedeiro-específico apresenta 20 genes desta família, possuindo uma quitinase do subgrupo C que não está presente em *M. anisopliae* (Junges, 2010; Gao *et al.*, 2011).

Nós classificamos os vinte e quatro genes identificados em cinco subgrupos, baseado em similaridade de sequências, relações filogenéticas, presença de domínios e características funcionais. Com nove genes agrupados no subgrupo A, sete genes no B, quatro genes no C, um gene no subgrupo D e três genes a um subgrupo contendo ENGases (Figura 7, 8 e 9).

A classificação utilizada atualmente para a família GH18 foi proposta para quitinases (Seidl *et al.*, 2005), sendo anterior as recém-descobertas ENGases. O gene do subgrupo D e os genes do subgrupo de ENGases, com ortólogos atualmente classificados no subgrupo B, agrupam-se filogeneticamente em um clado individualizado (Figura 9). A divergência de substrato entre quitinases e ENGases nos motivou a criar um subgrupo único para estas enzimas. Os genes desse subgrupo foram denominados *MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C*. Ubhayasekera

e Karlsson mostraram que o gene *chi18-15/chit36*, ortólogo do gene *chimaD1* (o único gene do subgrupo D), foi adquirido por transferência horizontal de uma bactéria relacionada ao gênero *Streptomyces* (Ihrmark *et al.*, 2010; Ubhayasekera e Karlsson, 2012). Outro ortólogo de *chimaD1*, o gene *Bbchit1*, de *Beauveria bassiana*, cuja a enzima que codificada possui atividade quitinolítica, têm sido alvo de intenso estudo por diversos grupos (Fang *et al.*, 2005; Fan, Zhang, *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). A superexpressão de uma cópia modificada deste gene acarretou em uma diminuição de 23% no tempo de morte da lagarta *Bombyx mori* (Fan, Fang, *et al.*, 2007), indicando que este gene pode estar envolvido em processos de infecção. Tendo em vista a provável origem evolutiva de *chimaD1*, e, por ser uma quitinase mais próxima filogeneticamente das ENGases do que de outras quitinases, nós o agrupamos em um subgrupo único (Junges *et al.*, submetido). O gene do subgrupo D e as ENGases são menores em relação aos outros membros da família GH18 de *M. anisopliae*, não possuindo íntrons nem domínios adicionais além do domínio GH18 em análises prévias (Figura 7) (Junges *et al.*, submetido).

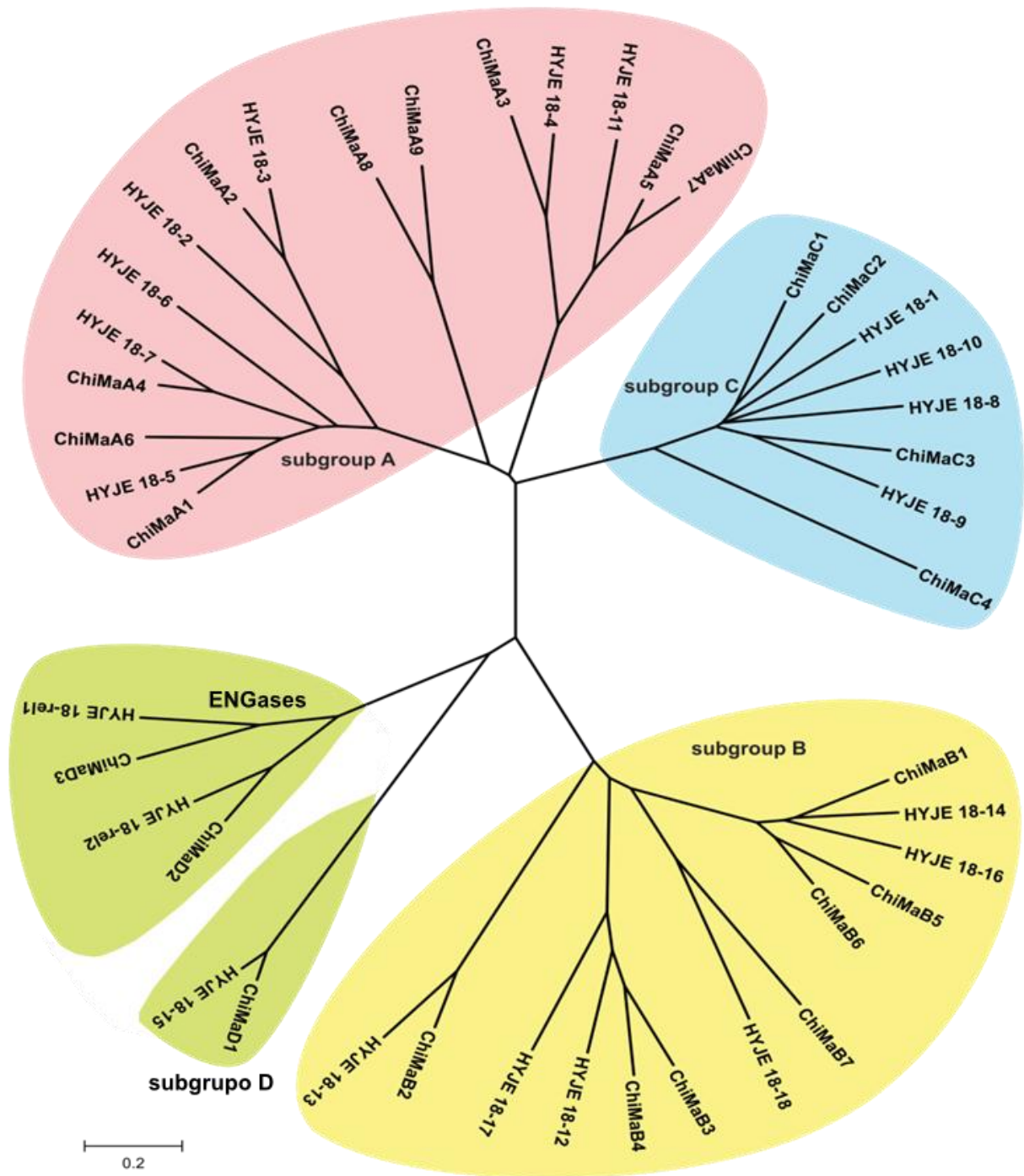


Figura 9: Árvore filogenética contendo genes da família GH18 de *M. anisopliae* e *H. jecorina*. A classificação proposta inicialmente para quitinases (Seidl *et al.*, 2005), foi baseada em trabalhos com o fungo *H. jecorina* (*T. reesei*). Em verde estão os dois novos subgrupos propostos (D e ENGases), em amarelo o subgrupo B, em azul o subgrupo C e em rosa o subgrupo A. MaChiMaD1, embora seja uma quitinase é mais idêntica as ENGases. ChiMaD2 (MaEng18B), ChiMaD3 (MaEng18C). O gene MaEng18A não está presente nesta árvore. Árvore construída pelo método de aproximação de vizinhos com 1.000 replicatas, utilizando o programa MEGA 6. A barra indica a distância genética, a qual é proporcional ao número de substituições de aminoácidos. Modificado de (Junges *et al.*, submetido).

1.4 Glicosilação

Embora ainda não se saiba como o processo de deglicosilação catalisado pelas ENGases afeta positiva ou negativamente o ciclo de vida do fungo, a glicosilação de proteínas é um processo bem caracterizado. A glicosilação é a modificação pós-traducional mais universal e diversa, sendo importante na funcionalidade de diversas proteínas. Ocorrendo de forma ubíqua em Eucariotos e em algumas espécies de Procariotos, tal modificação consiste em ligar um oligossacarídeo à cadeia de uma proteína (Nothhaft e Szymanski, 2013). Estimativas *in silico* indicam que mais de dois terços das proteínas são glicosiladas em Eucariotos (Apweiler, Hermjakob e Sharon, 1999; Shental-Bechor e Levy, 2009). Enzimas glicosiladas desempenham papéis centrais na adesão celular, interação entre macromoléculas e evasão de patógenos, auxiliando na regulação de diversos processos (Moremen, Tiemeyer e Nairn, 2012). A glicosilação tem sido extensivamente caracterizada em diversos modelos, principalmente em mamíferos, onde desordens no processo podem ocasionar diversas doenças (Freeze, 2013; Jaeken, 2013). Em mamíferos aproximadamente 700 proteínas estão envolvidas na montagem de glicanas compostas por 10 monossacarídeos diferentes: Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glicose (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), Ácido Glucorônico (GlcA), Ácido Idurônico (IdoA), Manose (Man), Ácido Siálico (AS) e Xilose (Xyl) (Moremen, Tiemeyer e Nairn, 2012). Outros organismos podem utilizar outros sacarídeos como a Ramnose no caso de *Streptococcus sanguis* (Erickson e Herzberg, 1993) ou o Ácido Pseudoamínico em *Campylobacter jejuni* (Goon *et al.*, 2003). Ocorrendo na luz do Retículo Endoplasmático (RE) e no Complexo de Golgi (CG), os diferentes sacarídeos podem ser arranjados de diferentes formas, sendo estes ligados as proteínas através de sequências consenso reconhecidas pelas enzimas envolvidas na catálise da reação (Spiro, 2002). Os principais tipos de glicosilação: N-glicosilação, O-glicosilação, C-manosilação e Glipiação, podem estar dispostos simultaneamente em uma mesma proteína (Figura 10).

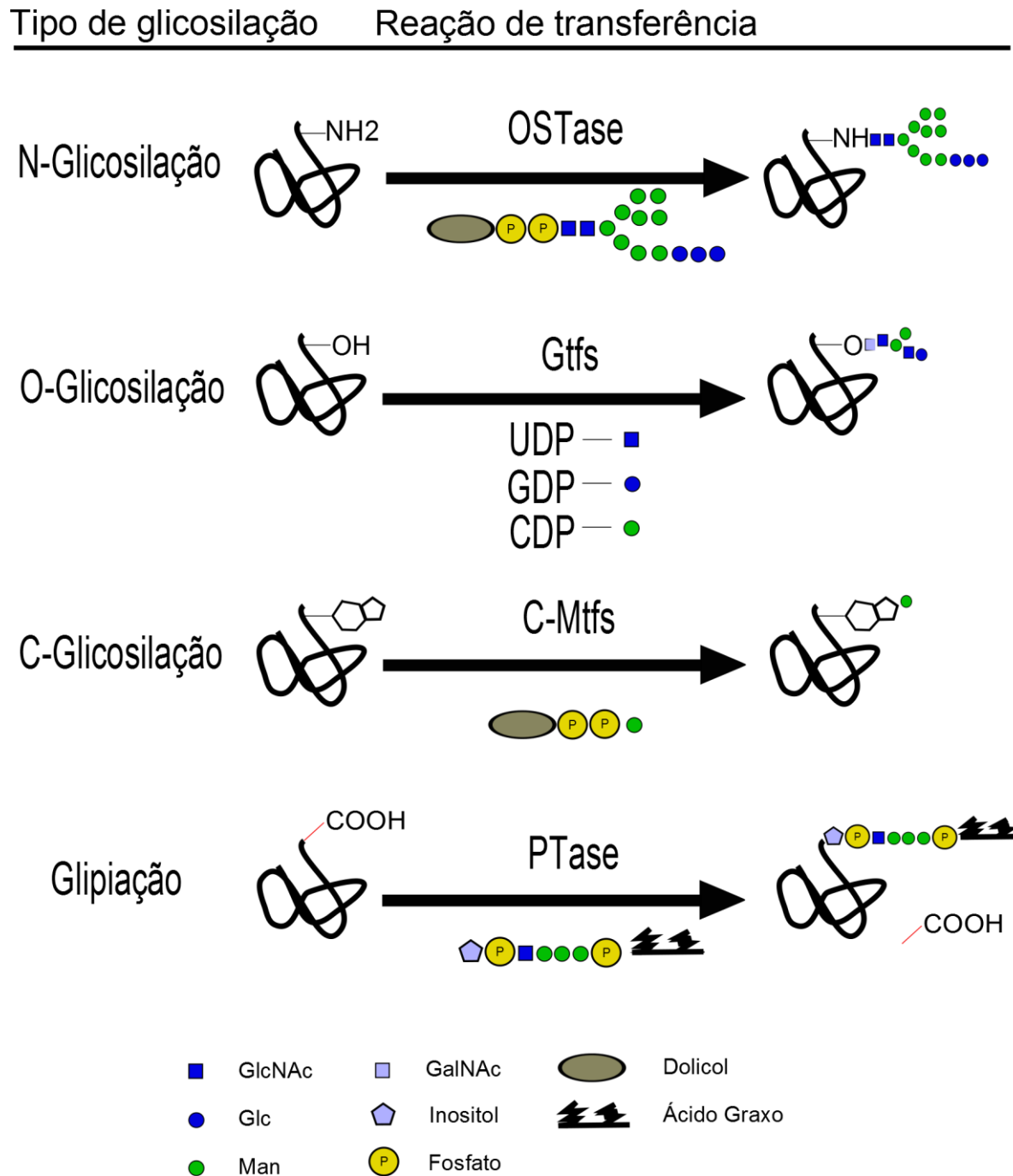


Figura 10: Representação esquemática dos tipos mais comuns de glicosilação: N-glicosilação, O-glicosilação, C-glicosilação e Glipiação. Resíduos aceptores, composição mais comum dos oligossacarídeos e enzimas responsáveis por catalisar a transferência do oligossacarídeo para a proteína são destacados (Moremen, Tiemeyer e Nairn, 2012). Representação de monossacarídeos segundo (Harvey *et al.*, 2009; Varki *et al.*, 2009).

1.3.1 N-glicosilação

A N-glicosilação é o tipo de modificação pós-traducional mais estudada e a primeira a ser descoberta. Está modificação, que ocorre no RE, é catalisada pela enzima oligossacaril-transferase (OT). Esta enzima é responsável pela transferência sítio-específica, de um oligossacarídeo já montado ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) que se

encontra ligado ao dolicol fosfato (Dol-PP), uma molécula lipídica (Figura 10)(Yan e Lennarz, 2005).

Os complexos processos de montagem dos oligossacarídeos e a sua transferência para a proteína tem sido extensivamente caracterizados, embora não sejam completamente entendidos. Tais processos envolvem a combinação de diferentes enzimas. A rota se inicia na membrana do RE, pela ligação dos primeiros monossacarídeos ao dolicol, uma molécula composta de isoprenoides, que deve ser fosforilada, formando o dolicol fosfato. Após a fosforilação, dois resíduos de GlcNAc e cinco resíduos de manose são adicionados sucessivamente ao dolicol fosfato, formando o Dol-PP-GlcNAc₂Man₅. Essa molécula é então translocada para o lúmen do ER para que mais resíduos possam ser adicionados (i.e. manose e glicose), formando o oligossacarídeo-base Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃. O processo de montagem do oligossacarídeo no lúmen do RE é altamente ordenado, devido à alta especificidade de substrato exibida pelas enzimas que participam da montagem. Uma vez montado, o carboidrato é transferido em bloco para a cadeia lateral de uma Asparagina, presente, geralmente, na sequência consenso de N-glicosilação Asn-X-Ser/Thr. Tal transferência é catalisada pela ação da OT. Uma vez glicosilada as proteínas são transportadas ao CG, onde podem ser adicionalmente modificadas (Breitling e Aebi, 2013).

Embora a sequência consenso de N-glicosilação Asn-X-Ser/Thr esteja presente na maioria das proteínas glicosiladas, tanto de Eucariotos como Procariotos, podem ocorrer variações. Assim sequências como Asn-X-Cys, Asn-Gly-X e Asn-X-Val, correspondem a 1-2% do total de sítios glicosilados em nematódeos, plantas e animais (Spiro, 2002; Breitling e Aebi, 2013).

Apenas 60% dos sítios possíveis de glicosilação de uma proteína são efetivamente glicosilados, sendo as razões para este fato pouco compreendidas. A presença de prolina entre, e nas proximidades da sequência consenso, é inibitório, assim como a posição do sítio na proteína também parece influenciar (Ben-Dor *et al.*, 2004). A distância da sequência consenso em relação a domínios transmembrana e a distância em relação à extremidade carboxi-terminal também podem influenciar a glicosilação, porém esse efeito parece ser proteína específico

(Nilsson e Von Heijne, 2000). A distância entre dois sítios de glicosilação também pode ser inibitório em algumas proteínas (Breitling e Aebi, 2013).

Em Eucariotos a ligação de glicanas a cadeia peptídica ocorre antes/durante o enovelamento das proteínas (com modelos sugerindo que a OT pode bloquear temporariamente o enovelamento, aumentando assim a eficiência da glicosilação (Ruiz-Canada, Kelleher e Gilmore, 2009)). Em Procariotos, que apresentam uma maquinaria de N-glicosilação bastante semelhante, a glicosilação somente ocorre após o enovelamento das proteínas. Essa diferença na montagem introduz mais um passo de regulação e complexidade em organismos eucarióticos, visto que os oligossacarídeos alteram de forma mais severa a conformação das proteínas. Dada à complexidade dos processos de N-glicosilação em Eucariotos, alguns autores sugerem uma possível pressão seletiva, a fim de acomodar o máximo de sítios possíveis de glicosilação em uma mesma proteína, aumentando assim o provável sucesso no enovelamento (Breitling e Aebi, 2013). De fato a glicosilação aumenta em muito a complexidade do proteoma. Uma proteína pode possuir diferentes glicofomas (diferentes isoformas glicosiladas da mesma proteína), cada uma podendo ser gerada em um tipo celular específico ou estágio de desenvolvimento específico (Berg, Tymoczko e Stryer, 2006).

1.4.1 *Endoplasmic-reticulum associated protein degradation (ERAD)*

Proteínas que serão secretadas e/ou glicosiladas devem ser encaminhadas para o RE. Enquanto proteínas com um correto enovelamento e montagem seguem até o seu destino final, proteínas que por algum motivo falham, ficarão retidas no RE e serão alvo de degradação pelo ERAD (Ruggiano, Foresti e Carvalho, 2014; Verchot, 2014). Essas proteínas defeituosas serão identificadas inicialmente por chaperonas, sendo translocadas para o citosol, onde sofrem poliubiquitinação para que possam ser degradadas pelo proteassoma (Goder, 2012). Proteínas N-glicosiladas, com erros no enovelamento, sofrem ação no RE de glicosidases, removendo os monômeros de glicose de seu terminal livre, e, algumas vezes, de manosidades. Quando translocadas para o citosol serão alvo, primariamente, de peptidil-N-glicosidases (PNGases EC: 3.5.1.52) que removem o oligossacarídeo da cadeia polipeptídica. Esse oligossacarídeo será então clivado por ENGases da família GH85 e manosidades do citosol, resultando em um polímero com apenas

cinco monômeros de manose e um de GlcNAc, que será encaminhado para o lisossomo (Tzelepis, G. *et al.*, 2014). Esta rota parece ser conservada na maioria dos Eucariotos, com exceção de fungos.

Em fungos o processo é mais complexo, uma vez que leveduras como *S. cerevisiae* possuem atividade de PNGase, porém, não apresentam ENGases da família GH85. Já fungos filamentosos como *T. atroviride* e *N. crassa* não possuem ENGases da família GH85 e suas PNGases não são funcionais (Tzelepis, G. *et al.*, 2014). Em *T. atroviride* uma mutação na tríade catalítica (Cys, His, Asp) de sua PNGase, onde cisteína foi substituída por valina, aboliu a atividade enzimática desta enzima (Tzelepis, G. *et al.*, 2014). Assim, como está via funciona, e quais proteínas estão envolvidas em fungos filamentosos, ainda deve ser elucidado. Uma das hipóteses é a da participação de ENGases da família GH18 (Dubey *et al.*, 2012; Tzelepis, G. *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVAS

Com o início da era genômica, o sequenciamento de diversos genomas de fungos filamentosos mostrou que a família GH18 possui um número muito maior de genes do que se pensava inicialmente. Esse número, e a variedade, não eram previstos, pois estas enzimas são estudadas a muito tempo em diferentes modelos. Uma das hipóteses levantadas para explicar o grande número de enzimas, é da redundância, defendida por certos grupos de pesquisa. Outra hipótese é de que estes genes desempenhem diferentes papéis, em diferentes processos e etapas do ciclo de vida de fungos filamentosos, como nutrição, diferenciação e autólise. Até a publicação dos estudos de Stals e colaboradores (2010) com ENGases, acreditava-se que a família GH18 em fungos filamentosos era composta apenas por quitinases. Essa nova classe de enzimas que tem sido alvo de recentes trabalhos pode estar envolvida no ERAD e em outros processos. Porém a exata função, sua regulação e alvos de deglicosilação permanecem incertos. Portanto a descrição da função de quitinases e ENGases é um tema importante atualmente.

Os fungos filamentosos são modelos de estudo importantes em diversas áreas. Em particular fungos do gênero *Metarhizium* são modelos que oferecem ótimas condições para a descoberta da função de genes da família GH18. Além do processo natural de reformulação da parede celular e seus diferentes estágios de

desenvolvimento como saprófita, esse fungo é capaz de transpassar a carapaça de artrópodes com a participação de quitinases, e possivelmente de ENGases. No processo de infecção de seus hospedeiros *Metarhizum* também alterna entre diferentes tipos celulares (conídios, hifas, apressório, blastosporo) onde reformulações da parede celular ocorrem com a participação de quitinases. Neste sentido a construção de mutantes funcionais para genes da família GH18 em *M. anisopliae* pode ser de grande valia no estudo da função desta família no ciclo de vida de diferentes fungos filamentosos.

O objetivo de nosso grupo de pesquisa é a caracterização do modo de ação de cada uma das 24 enzimas putativas com o domínio GH18 descritas no genoma da linhagem E6 de *M. anisopliae*. Mais especificamente neste trabalho iniciamos a caracterização dos genes incluídos nos subgrupos D e de ENGases pela construção de mutantes funcionais, avaliando o fenótipo e a capacidade de infecção a hospedeiros artrópodes destes mutantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar como os 24 genes da família GH18 afetam o ciclo de vida de *M. anisopliae*.

3.2 Objetivos Específicos

Interromper as sequências codificadoras de quatro genes putativos que codificam três ENGases putativas da família GH18 (*MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C*) e uma quitinase putativa (*chimaD1*), utilizando a metodologia de transformação mediada por *A. tumefaciens*;

Construção e transformação de um vetor contendo a marca de resistência a Chlorimuron-etil, o gene *sur*, em *M. anisopliae*;

Reinsere os genes *chimaD1*, *MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C*, em seus respectivos mutantes funcionais, restabelecendo o fenótipo selvagem, utilizando na construção o gene *sur* como marca de resistência complementar;

Avaliar, fenotipicamente, como a ausência do produto destes genes, afeta positiva e negativamente, diferentes processos durante o ciclo de vida e infecção de *M. anisopliae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises Filogenéticas, Predição de Domínios e Sítios.

As sequências de aminoácidos e nucleotídeos utilizadas, no trabalho foram coletadas utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), sendo as sequências descritas nas legendas das figuras. O genoma da linhagem E6 de *M. anisopliae* foi recentemente sequenciado em uma parceria com o LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica) (Staats *et al.*, submetido), sendo utilizado como fonte de sequência para este organismo. As sequências foram primariamente alinhadas utilizando o ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Árvores filogenéticas foram construídas no MEGA 6, utilizando algoritmos de máxima verossimilhança e aproximação dos vizinhos (*Neighbor joining*) com 1.000 reamostragens (Tamura *et al.*, 2013). A visualização de aminoácidos conservados foi feita utilizando o GeneDoc (Nicholas, Nicholas H.B. Jr. e Deerfield, 1997). Matrizes de identidade foram construídas utilizando o Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011; McWilliam *et al.*, 2013).

Análises prévias para aferição de domínios conservados, sítios de glicosilação e presença de peptídeo sinal já foram conduzidas (Junges *et al.*, submetido). Algumas destas análises foram refeitas, com um enfoque maior para os genes explorados nesse trabalho. A presença de domínios com possível importância no metabolismo de carboidratos foi avaliada pelo dbCAN. A presença de resíduos de ligação a manose foi avaliado através do PreMieR (Agarwal *et al.*, 2011). A predição de sítios de N-, O- e C-glicosilação foram feitas utilizando o GlycoEP (Chauhan, Rao e Raghava, 2013).

4.2 Linhagens, Reagentes e Meios de Cultura

A linhagem E6 de *M. anisopliae* foi escolhida para a construção dos mutantes funcionais. Tal linhagem foi obtida da coleção da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Brasil) e mantida em Meio de Cove Completo (MCc) como descrito previamente (Dutra *et al.*, 2004). A linhagem E6 se mostrou altamente virulenta quando em contato com diferentes hospedeiros artrópodes (Lubeck *et al.*, 2008; Boldo *et al.*, 2009) e possui seu genoma sequenciado. As linhagens de *Escherichia coli* KC8, TG2 e TOP10 foram utilizadas para as clonagens previstas, a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foi utilizada na Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Essas linhagens

bacterianas foram obtidas da coleção própria do laboratório e propagadas no meio de cultura de Luria-Bertani (LB) com os antibióticos adequados (Sambrook e Russel, 2001). Meios de cultura e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Enzimas de restrição, clonagem e ferramentas moleculares foram adquiridas da Promega (Fitchburg, WI, USA) ou Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) ou Life Technologies (Grand Island, NY, USA) ou GE Healthcare (Little Chalfont, UK). O Meio Mínimo (MM) utilizado para o cultivo de *M. anisopliae* é o mesmo descrito previamente (Staats *et al.*, 2013).

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
D1_5FOR	GTACCATTTCAGAGTTATCA
D1_5REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCAGTGTACAGGAACAACCTTTTCGCAATCA
D1_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCAGAGGCTGGTGGCACAAGAC
D1_3REV	GGCCAGGAAATAGCACCGGA
D1_NESTED_F	TATGACCATGATTACGTCCAAATTCATCCCGGCTG
D1_NESTED_R	CAGGTCGACTCTAGAAATCTCTTGCAAATTTGGCC
qPCRD1_FOR	GTGGTGGCTCAACATGCAGTAC
qPCRD1_REV	GCCCTTTATCCAAGCAGTCGGT
D2_5FOR	GTTTGAGGAGTGATTACAGAC
D2_5REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCAGTGTACAGTGTGAGTATTGAGGCTGTTG
D2_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCAGACATGAAGAGGGGAATAAT
D2_3REV	CATGATGCCATTTGCTGGAC
D2_NESTED_F	TATGACCATGATTACGTAGCCGAACCCTGGCCCTT
D2_NESTED_R	CAGGTCGACTCTAGAGACGATATGGATCACCAATC
qPCRD2_FOR	CGCCACTACGACAGCTCATC
qPCRD2_REV	TCGAAGCCGCTCAGGTTCTT
D3_5FOR	GAGAGCCAGGATTCTGGCTT
D3_5REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCAGTGTACAGGCTTCCAGCCTGTGGTCTGC
D3_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTCGGAGTCGGGCTTCCCATC
D3_3REV	GTGAGTGGCTTTGTTATGTC
D3_NESTED_F	TATGACCATGATTACAGTGTTAACC GGATCTGTGC
D3_NESTED_R	CAGGTCGACTCTAGAAGGCCATAAGGAGCGAAATC
qPCRD3_FOR	TGGTGGCTGGACAGCTTTCTTC
qPCRD3_REV	ACCTCCAAGGTTTCATCCATGCC
D4_5FOR	TCCTGCTACAACGAGACCGT
D4_5REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCAGTGTACAGGTTTGCGACAGAGCAAAGGT
D4_3FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCAGTCATGGATCTAGATATTT
D4_3REV	TGAAGGCGAAAGACCTTTAT
D4_NESTED_F	TGGATGCCGACACTAGTCAC
D4_NESTED_R	ATGAACAATGTTCCAAGCCC
qPCR_D4_FOR	CCCCAGVCAATGGCTACGGATAC
qPCR_D4_REV	TGCGCCCATTTCCAAGGTTT
BAR_FOR_1880	CTGTACAGTGACCGGTGACT
BAR_REV_1880	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG
5SU	TCGACGTGCCAACGCCACA
3SU	TCGACGTGAGAGCATGCAATTC

4.3 Cassetes de Deleção para a construção de Mutantes Funcionais.

Para construção dos vetores de deleção foi utilizado um processo de três etapas, visando facilitar a manipulação e obtenção dos vetores binários finais, que serão submetidos à metodologia de ATMT. (I) Regiões de aproximadamente 1.000 pares de bases, que flaqueiam as regiões codificantes, para três genes da família GH18 (*chimaD1*, *MaEng18A* e *MaEng18C*), foram amplificadas através da metodologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando a Platinum® *Taq Polymerase High Fidelity* e os oligonucleotídeos listados na Tabela 1, sendo os produtos finais purificados. Essas regiões flanqueadoras foram combinadas com um fragmento de 1.880 pares de bases contendo o gene *bar* (marca de resistência para Glifosinato de amônio), e submetidas à metodologia de PCR de fusão (Yu *et al.*, 2004). (II) Os *cassettes* finais de 3.880 pares de bases foram clonados no vetor de entrada pCR2.1-TOPO (TOPO-TA Cloning, Invitrogen) gerando os vetores pCR2.1- Δ ChimaD1, pCR2.1- Δ MaEng18A e pCR2.1- Δ MaEng18C. (III) Os vetores pCR2.1- Δ ChimaD1 e pCR2.1- Δ MaEng18C foram então clivados com as enzimas *SacI* e *XbaI*, e os produtos gerados, de aproximadamente 3.900 pares de bases, após purificação, foram clonados nos sítios de *SacI* e *XbaI* do vetor binário pPZP201BK, gerando os vetores pPZP201BK- Δ ChimaD1 e pPZP201BK- Δ MaEng18C. Esses vetores foram confirmados por PCR e clivagem de sítios internos.

O vetor pCB1532, o qual contém o alelo de resistência ao Chlorimuron-etil, foi gentilmente providenciado pelos pesquisadores Aline S. Romão-Dumaresq, Welington Luiz de Araújo, Nicholas J. Talbot e Christopher R. Thornton. A marca de resistência, de 2.800 pares de bases, foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos 5SU e 3SU (Tabela 1). O produto resultante foi então clonado no vetor de entrada pCR2.1-TOPO, gerando o vetor pCR2.1-Sur. Esse vetor foi então clivado com as enzimas *EcoRV* e *BamHI*, e o fragmento resultante foi clonado nos sítios de *EcoRV* e *BamHI* do vetor binário pPZP201BK, gerando o vetor pPZP201BK-Sur. A esse vetor foi acrescentado o gene *bar* seguindo a metodologia descrita por (Green e Sambrook, 2012) para clonagem de produtos de PCR, gerando o vetor pPZP201BK-Sur/Bar. Tal vetor foi construído como um controle para a ATMT.

4.4 Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) e Confirmação dos Mutantes funcionais para o gene *chimaD1*.

A linhagem E6 de *M. anisopliae* foi submetido à metodologia de ATMT, seguindo o protocolo previamente descrito, e o vetor binário pPZP201BK- Δ ChimaD1 (Staats *et al.*, 2007). Os mutantes foram selecionados utilizando a resistência ao herbicida glifosinato de amônio em meio MM. Tendo em vista o baixo número de positivos com correta recombinação homóloga, oriundos da metodologia de ATMT (Frandsen, 2011), faz-se necessário uma primeira confirmação por PCR amplificando uma região interna que estará ausente caso a correta recombinação homóloga aconteça. Para esta primeira confirmação, o DNA foi extraído pelo método de micro-ondas (Ferreira e Glass, 1996), e o PCR de confirmação foi repetido três vezes para cada possível mutante. Dez mutantes foram selecionados, tendo seu DNA extraído pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001). As amostras foram então analisadas através de um PCR Multiplex, amplificando tanto a região inteira como o gene *bar*. Seis mutantes foram então submetidos à metodologia de *Southern blotting* através do método de AlkPhos, confirmando a correta inserção do cassete de inativação no genoma do fungo.

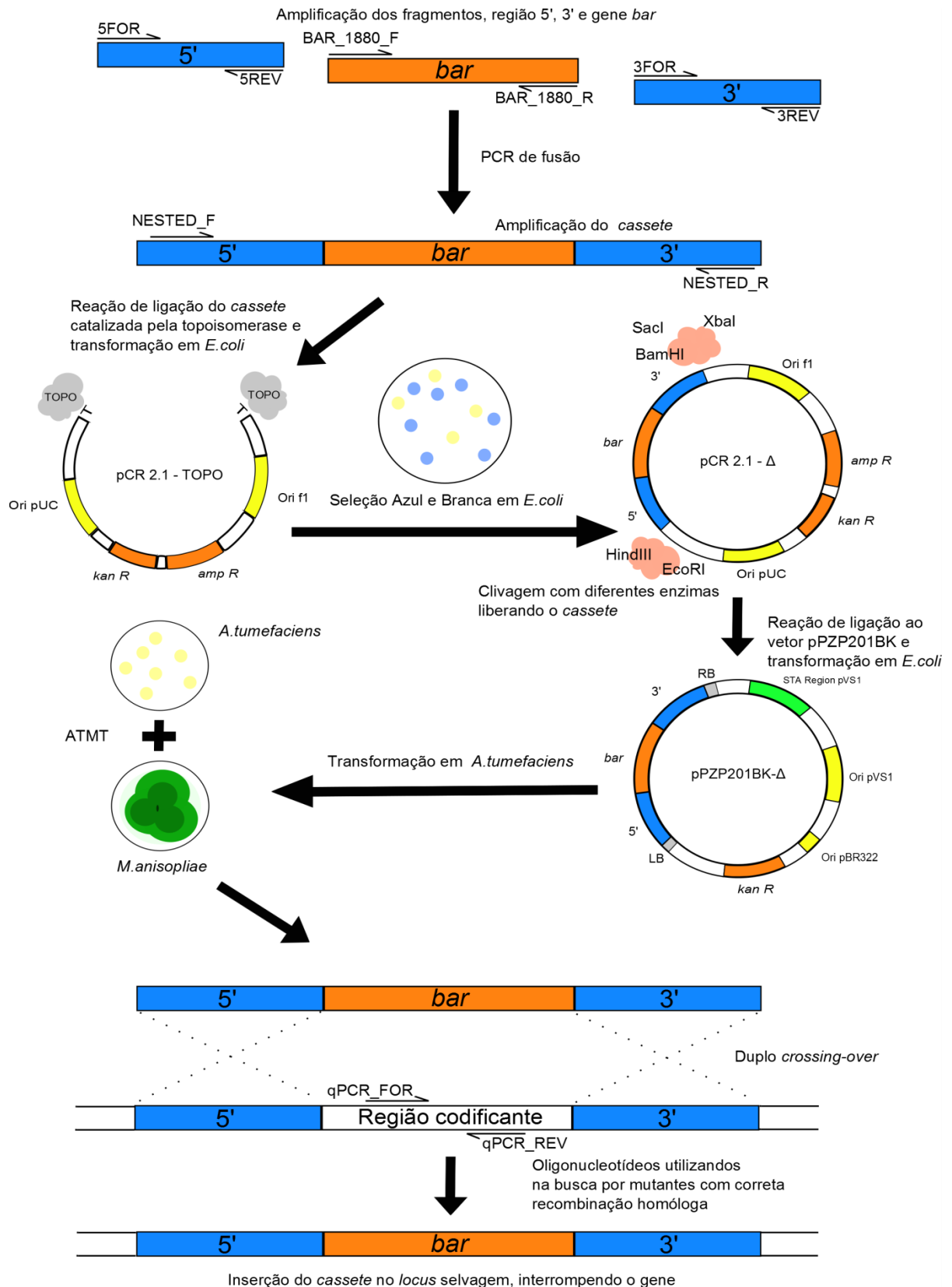


Figura 11: Esquema teórico de realização do projeto. Ori pUC, Ori f1, Ori pBR322, Ori pVS1 – Origens de replicação dos plasmídeos; *Amp R* e *kan R* – Marcas de resistência a ampicilina e canamicina; Bordas LB e RB do T-DNA – Regiões que vão recombinar com o genoma do hospedeiro; STA Region pVS1 – Em conjunto com a Ori pVS1 essas regiões mantêm o vetor binário estável em *A. tumefaciens* mesmo sem pressão seletiva (Vanderbij

et al., 1996). Construções não estão em escala. Figura baseada em (Yu *et al.*, 2004; Boldo *et al.*, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Filogenéticas, Predição de Domínios e Sítios

A caracterização dos 24 genes da família GH18 foi iniciada por Junges e colaboradores (submetido). No trabalho foram identificados os 24 genes e a expressão de 23 deles (A expressão de *MaEng18A* não foi avaliada) foi detectada ao menos em uma, de seis condições de cultivo testadas (conídio, apressório, blastosporo, MM + GlcNAc, MM + quitina, MCc, autólise e crescimento na cutícula de *R. microplus*). Adicionalmente esses genes foram analisados com o auxílio de diferentes plataformas, avaliando características das proteínas como sítios de glicosilação, presença de peptídeo sinal e localização celular, organização e presença de domínios. Análises filogenéticas nos levaram a sugerir uma mudança na atual classificação dos genes da família GH18, com a criação dos subgrupos D e de ENGases, que se encontram agrupados no subgrupo B. A construção de mutantes funcionais para cada um dos 24 genes, assim como mutantes com silenciamento de múltiplos genes são o próximo passo na caracterização desta família em *M. anisopliae*, e estão em desenvolvimento por nosso grupo.

Os genes *chimaD1*, *MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C* foram exaustivamente analisados com o auxílio de plataformas diferentes daquelas utilizadas anteriormente, na tentativa de identificar domínios adicionais, sítios de glicosilação e sua conservação em ortólogos e resíduos adicionais que seriam importantes para a catalise da reação. Os métodos de máxima verossimilhança e aproximação de vizinhos (*neighbor-joining*) se mostraram adequados na construção das árvores filogenéticas agrupando ortólogos destes genes. As sequências utilizadas na construção das árvores filogenéticas foram aquelas que apresentaram identidade superior a 50% nos alinhamentos montados utilizando BLAST, utilizando como entrada, as sequências de aminoácidos de MaChiMaD1, MaEng18A, MaEng18B e MaEng18C.

Tanto quitinases como ENGases da família GH18 de fungos, apresentam uma estrutura gênica bastante semelhante, embora a região codante das ENGases não seja interrompida por íntrons, e sejam um pouco menores. O domínio GH18 de quitinases é claramente distinguido por apresentar dois motivos bastante conservados: SxGG e DxxDxDxE, sendo ambos importantes para a catálise.

Enquanto o motivo SxGG é um sítio importante para ligação ao substrato, o motivo DxxDxDxE corresponde ao centro catalítico. As análises no banco de dados do dbCAN, que abriga domínios importantes no metabolismo de carboidratos, não identificaram nenhum domínio adicional, além do GH18, em MaChiMaD1, MaEng18A, MaEng18B e MaEng18C. Utilizamos o dbCAN tendo em vista sua ligação com o Cazy, sendo atualmente altamente recomendável sua utilização para anotação de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Uma mutação nunca antes relatada foi observada neste trabalho. As ENGases caracterizadas até o momento, assim como as ENGases putativas de *M. anisopliae*, apresentam uma substituição no motivo SxGG, onde, no lugar da Serina, se encontra uma Metionina (MxGG) (Figura 12). Tal mutação pode explicar porque as ENGases não utilizam quitina como substrato. Este motivo, nas ENGases bacterianas da família GH18, se encontra completamente degenerado (Stals *et al.*, 2012).

Stals e colaboradores (2012) especularam sobre outros sítios que seriam importantes na atividade catalítica de ENGases e no reconhecimento do substrato. Embora, o motivo DxxDxDxE seja conservado em MaEng18B e MaEng18C, e em todas as quitinases de *M. anisopliae*, esse sítio não é totalmente conservado em MaEng18A e Endo T. Quando comparados os motivos catalíticos de ENGases bacterianas e fúngicas, apenas os dois últimos aminoácidos ácidos são conservados, assim como um resíduo de Glicina (GxxxDxE). Este resíduo de Glicina é conservado em todos os membros da família GH18 de *M. anisopliae*. Na reação de hidrólise o ácido glutâmico atua como doador de prótons, enquanto o ácido aspártico auxilia na estabilização da reação (Van Aalten *et al.*, 2000; Stals *et al.*, 2012). Duas tirosinas e um triptofano em Endo T, listados por Stals, como resíduos provavelmente importantes na interação com o substrato, são conservados nas ENGases de *M. anisopliae* (Figura 12).

Adicionalmente, as sequências de aminoácidos das ENGases foram analisadas utilizando o PreMieR (Agarwal *et al.*, 2011), a fim de identificar possíveis resíduos de ligação a manose que auxiliariam no reconhecimento do substrato. Nenhum sítio consenso foi identificado nas três proteínas (MaEng18A, MaEng18B e MaEng18C). Estratégias que explorem como as ENGases ligam-se a N-oligossacarídeos, em detrimento a quitina são de interesse e podem ser exploradas futuramente.

MaEng18B : M-----*-----20-----*-----40	MaEng18B : MSLAGIVRLIRLRADDFGEGFVITLAPVAMALLDPEKNLS : 176
Mr : M-----*-----20-----*-----40	Mr : MSLAGIVRLIRLRADDFGEGFVITLAPVAMALLDPEKNLS : 176
Mac : M-----*-----20-----*-----40	Mac : MSLGGIIRLIRLRADDFGEGFVITLAPVAMALLDPEKNLS : 174
Eng18B : M-----*-----20-----*-----40	Eng18B : MSLGGVVKLIRLRSDFGKGFVITLAPVAMALLDHRNLS : 177
MaEng18C : MFRSLYLAILIPLSLASPIVEVVY--TIPILPRLVWYFQ : 38	MaEng18C : MSQDGIERLIDKIHCDFGSGFIITLAPVASALKN--GGNLS : 195
MaEng18A : M-LKSCLIAAALAAVSLASPIHQVVR--AVAELPRLVWYFQ : 37	MaEng18A : MSQAGIERLVKLRSDFGKGFVITLAPVASALS--GGNLS : 194
Mr2 : M-LKSCLIAAALAAVSLASPIHQVVR--AVAELPRLVWYFQ : 37	Mr2 : MSQAGIERLVKLRSDFGKGFVITLAPVASALS--GGNLS : 194
Mac2 : MLLKSCLIAAALAAVSLASPIHQVVR--AVDELPRVWYFQ : 38	Mac2 : MSQAGIERLVKLRSDFGKGFVITLAPVASALS--GGNLS : 195
Eng18A : MKASVYLASLLATLSMAVPEVKELQLRAEPTDLPRLVWYFQ : 40	Eng18A : MSQAGIERLVKLRSDFGKGFVITLAPVASALS--SSNLS : 198
M P6 LPR66 Y5Q	MS G6 4L6d46r DFGp F6ITLAPVA AL NLS
MaEng18B : THETPSGEHISVLPPLITRPSISLTHLIIAACHINASPQL : 59	MaEng18B : GFDYERLEVMRFGKQIAWYNTQFYCGWGNLNTIMYDMLQ : 216
Mr : THETPSGEHISVLPPLITRPSISLTHLIIAACHINASPQL : 59	Mr : GFDYERLEVMRFGKQIAWYNTQFYCGWGNLNTIMYDMLQ : 216
Mac : THETPSGEHISVLPPLITRPSISLTHLIIAACHINASPQL : 59	Mac : GFDYERLEVMRFGKQIAWYNTQFYCGWGNLNTIMYDMLQ : 214
Eng18B : THETPSGEHISVLPPLITRPSISLTHLIIAACHINASPQL : 60	Eng18B : GFDYERLEVMRFGKQIAWYNTQFYCGWGNLNTIMYDMLQ : 217
MaEng18C : TTHDSNCAPISMLPLIKDKSIALTHIISSEFHVQKN-REI : 77	MaEng18C : GLDYKILEYRFGKQIAWYNTQFYCGWGNLNTIMYDMLQ : 235
MaEng18A : TTHDSNGRPI SMLPLIEKGIALTHLIVCSLHVNEN-GOI : 76	MaEng18A : GFDYKILDSRFGSKINFYNGQFYSGFGMSRPTDYTNVVS : 234
Mr2 : TTHDSNGRPI SMLPLIEKGIALTHLIVCSLHVNEN-GOI : 76	Mr2 : GFDYKILDSRFGSKINFYNGQFYSGFGMSRPTDYTNVVS : 234
Mac2 : TTHDSNGRPI SMLPLIEKGIALTHLIVCSLHVNEN-GOI : 77	Mac2 : GFDYKILDSRFGSKINFYNGQFYSGFGMSRPTDYTNVVS : 235
Eng18A : TTHDSNRPI SMLPLIEKGIALTHLIVCSFHINQG-GVY : 79	Eng18A : GFSYALQQTGNDIDWYNTQFYSGFGMSRPTDYTNVVS : 238
T H sg IS6LPL6 I LTH6I6 H6n 6	GfdY L G I 5YN QFY G5G 6 Y 66
MaEng18B : TLNDHPPSHPRFQILWAEELRVLQASGVKVLMLGGAAEGT : 99	MaEng18B : KGWSPKLVVGVVVTNEANGSGFVWPWEMLSAILAILHRRHR : 256
Mr : TLNDHPPSHPRFQILWAEELRVLQASGVKVLMLGGAAEGT : 99	Mr : KGWSPKLVVGVVVTNEANGSGFVWPWEMLSAILAILHRRHR : 256
Mac : TLNDHPPSHPRFQILWAEELRVLQASGVKVLMLGGAAEGT : 99	Mac : KGWSPKLVVGVVVTNEANGSGFVWPWEMLSAILAILHRRHR : 254
Eng18B : TLNDHPPSHPRFQILWAEELRVLQASGVKVLMLGGAAEGT : 100	Eng18B : KGWPIEKVWVGLVVTNEANGSGFVWIEFLSEVITLLGRHE : 257
MaEng18C : HLNDHPPSHPRFQILWNETRIMKEAGVKKVMGIGGAAFGS : 117	MaEng18C : NGFKASRVVAGQLSSGTLTYDRLGQLNINNTIVSLREKYG : 275
MaEng18A : HLNDHPPSNPMFYILWNETAVMKNAQVKKIMGVGGAAFGS : 116	MaEng18A : NGFSASRVVAGQLTSSENGYGYIPYEQLNATVLSLRDRYK : 274
Mr2 : HLNDHPPSNPMFYILWNETAVMKNAQVKKIMGVGGAAFGS : 116	Mr2 : NGFSASRVVAGQLTSSENGYGYIPYEQLNATVLSLRDRYK : 274
Mac2 : HLNDHPPSNPMFYILWNETAVMKNAQVKKIMGVGGAAFGS : 117	Mac2 : SGFSASRVVAGQLTSSENGYGYIPYEQLNATVLSLRSTYK : 275
Eng18A : HLNDHPPDDPFYILWNETITMKQAGVKKVMGVGGAAFGS : 119	Eng18A : NGFAPAKVVGQLTTEG-AQWIPVTSSLNNTIVSLVSEYK : 277
LND PPs P F tLW E 6 GVK66 M6GGAAPG3	G5 46V G 63 p g g 6p e 6 a 6 L
MaEng18B : YQRDSEPF--DQFESYAPLRQLIDDKNLDGVLDLVEEP : 136	MaEng18B : NFGGVMGWEYFNSLPGDASRFEWAGNMSLLR--AHSLG : 294
Mr : YQRDSEPF--DQFESYAPLRQLIDDKNLDGVLDLVEEP : 136	Mr : NFGGVMGWEYFNSLPGDASRFEWAGNMSLLR--AHSLG : 294
Mac : YQRLES----DQFERYAPLRQLIFERNLDGVLDLVEEP : 134	Mac : NFGGVMGWEYFNSLPGDASRFEWAGNMSLLR--AHSLG : 292
Eng18B : YARLDASD---EQFERYYRPLRDVIRARGLDGLDLVEEE : 137	Eng18B : RFGGVMGWEYFNSLPGGHERFEWAGNMSLLR--AHSLG : 297
MaEng18C : FTSETLDG-DEDVFERYYTQIREVIFRYELDGLDIDVEQP : 156	MaEng18C : RIGGIMGWEYGLSVTRGMDPEWRWACAMTQILR----PKF : 311
MaEng18A : FSSGTLDG-DTATENKYYGQLRDVIRKFKLQGLDIDVEQP : 155	MaEng18A : QIGGVMGWEYFNSAPGGTDEPWKWAQIMTQILRPNVPEKL : 314
Mr2 : FSSGTLDG-DTATENKYYGQLRDVIRKFKLQGLDIDVEQP : 155	Mr2 : QIGGVMGWEYFNSAPGGTDEPWKWAQIMTQILRPNVPEKL : 314
Mac2 : FSSGTLDG-DKATENKYYGQLRDVIRKFKLQGLDIDVEQP : 156	Mac2 : QIGGVMGWEYFNSAPGGTDEPWKWAQIMTQILRPNVPEKL : 315
Eng18A : FNTQTLDSPDSATFERYYGQLRDAIVNEQLEGMGLDIDVEQP : 159	Eng18A : QIGGVMGWEYFNSLPGGTABEWEWAQIVTQILRPNVPEKL : 317
5 F YY 64 I L G6D6DVE2p	GG6MGWEYfns pq FW WA 63 6LR

Figura 12: Motivos e resíduos importantes para a catálise das ENGase. Em verde os motivos MxGG e GxxxDxE. Em vermelho os resíduos, teoricamente importantes para a ligação ao substrato. Mr- *M. robertsii*, ortólogo de MaEng18B (XP_007822416.1); Mac- *M. acridum*, ortólogo de MaEng18B (XP_007814209.1); Eng18B (XP_006964679.1); Mr2- *M. robertsii*, ortólogo de MaEng18A (XP_007823947.1); Mac2- *M. acridum*, ortólogo de MaEng18A (XP_007815036.1); Eng18A (CAZ16624.1). Sequências de Eng18A e Eng18B foram retiradas de (Stals *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2012), as sequências de *M. acridum* e *M. robertsii* foram obtidas através de alinhamentos utilizando o BLAST com os ortólogos de *M. anisopliae*.

5.1.1 Análises *in silico* da quitinase MaChiMaD1 de *M. anisopliae*

Atualmente a origem evolutiva de fungos entomopatogênicos tem recebido mais atenção na literatura. A ordem Hypocreales, a qual abriga diversos fungos micoparasitas, fitopatógenos, entomopatógenos, endofíticos e saprofíticos inclui sete famílias: *Clavicipitaceae*, *Hypocreaceae*, *Bionectriaceae*, *Cordycipitaceae*, *Nectriaceae*, *Niessliaceae* e *Ophiocordycipitaceae*. Três famílias abrigam gêneros amplamente utilizados em controle biológico de pragas: *Hypocreaceae*, *Clavicipitaceae* e *Cordycipitaceae*, sendo as famílias *Clavicipitaceae* e *Cordycipitaceae* de fungos entomopatogênicos (A família *Ophiocordycipitaceae* também abriga fungos entomopatogênicos). Uma das hipóteses para explicar a origem de fungos entomopatogênicos na ordem Hypocreales, é a de que fungos como *M. anisopliae* (*Clavicipitaceae*) e *B. bassiana* (*Cordycipitaceae*) possuem um ancestral no gênero *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) que evoluiu para um estilo de vida entomopatogênico (Xiao *et al.*, 2012). De fato, ao compararmos os genomas de *M. anisopliae*, *M. roberstii* e *M. acridum* com fungos do gênero *Trichoderma* encontramos alta similaridade de sequências, com muitos genes compartilhados entre ambos os gêneros.

Ortólogos da proteína chi18-15 são encontrados em todos os membros do gênero *Trichoderma* com genoma sequenciados, apresentando alta similaridade de sequências de aminoácidos com MaChiMaD1 (Tabela 2). Tanto chi18-15 como MaChiMaD1 são ortólogos da quitinase ChiJ encontrada em bactérias do gênero *Streptomyces*, tendo sido comprovada a transferência horizontal bactéria-fungo do gene *chi18-15* em *Trichoderma* (Ubhayasekera e Karlsson, 2012). Ortólogos nas famílias *Bionectriaceae* e *Cordycipitaceae* também foram encontrados em nossa análise, estando ausentes nas famílias *Nectriaceae*, *Niessliaceae* e *Ophiocordycipitaceae*. Os resultados, com este gene, estão de acordo com a corrente hipótese evolutiva, indicando que as famílias *Hypocreaceae*, *Clavicipitaceae*, *Bionectriaceae* e *Cordycipitaceae* são mais próximas entre si do que as demais (Figura 13).

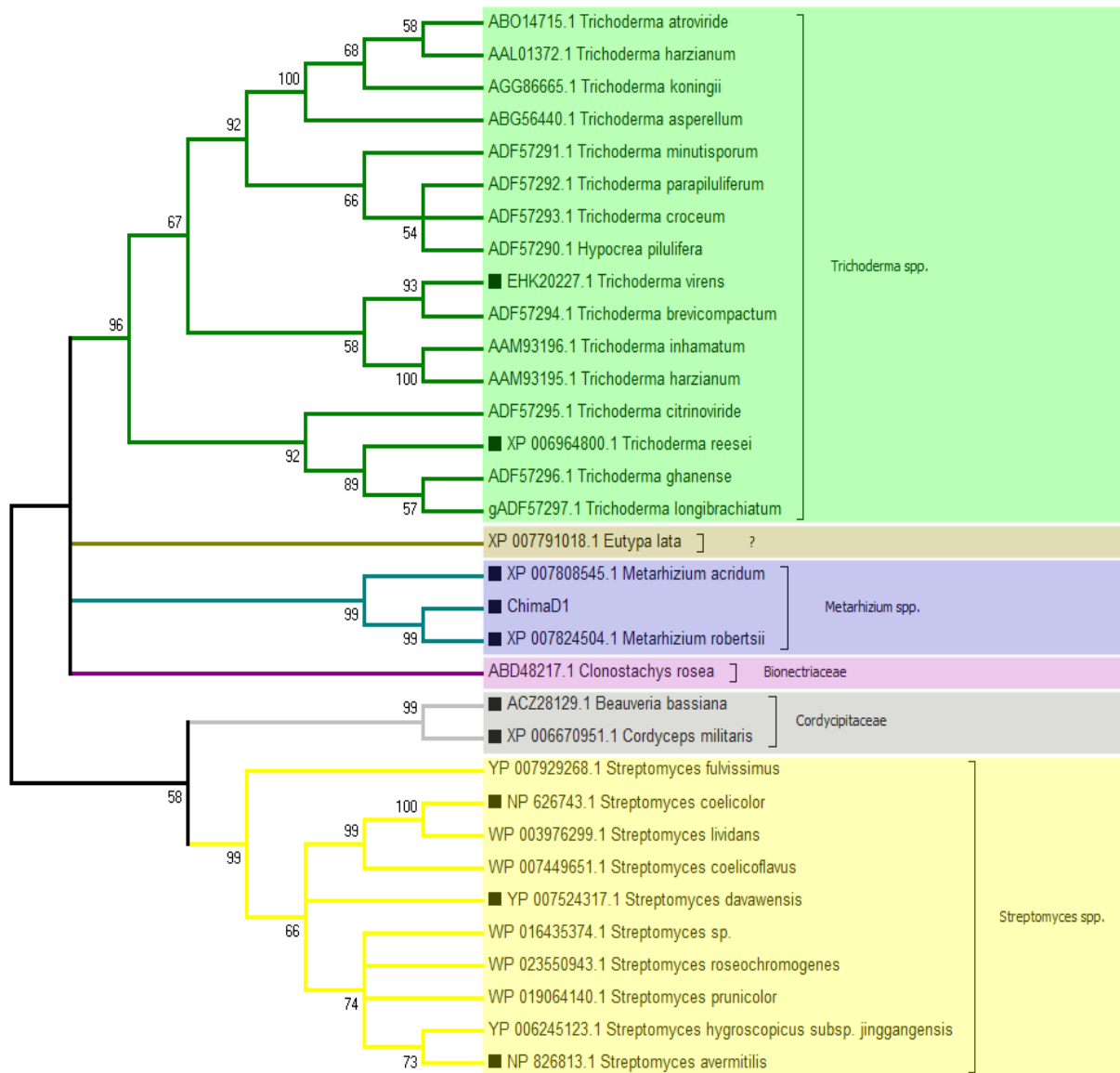


Figura 13: Árvore filogenética agrupando ortólogos da quitinase MaChiMaD1. *Bootstrap consensus tree*, obtida a partir do método de aproximação de vizinhos com 1.000 reamostragens. Curiosamente seqüências de fungos da família *Cordycipitaceae* são mais próximas de seqüências de *Streptomyces spp.* Seqüências identificadas com (■) foram utilizadas na Tabela 2. Verde - Ortólogos do gênero *Trichoderma*; Verde musgo – Ortólogo de *E. lata*; Azul – MaChiMaD1 e ortólogos do gênero *Metarhizium*; Roxo – Ortólogo de *C. rosea*; Amarelo – Ortólogos do gênero bacteriano *Streptomyces*.

Tabela 2: Matriz de identidade de aminoácidos agrupando ortólogos da quitinase MaChiMaD1.

Organismo	Ma	Mr	Mac	Bb	Cm	Cr	Tr	El	As	Sc
Ma	100	95.94	89.57	78.78	78.26	79.13	83.67	77.68	78.53	75.36
Mr	95.94	100	90.72	79.65	77.97	80.29	84.55	79.42	78.53	75.94
Mac	89.57	90.72	100	77.91	77.68	79.71	84.26	79.71	77.65	74.78
Bb	79.65	78.78	77.91	100	85.06	76.95	78.36	75.36	75.73	75.50
Cm	78.26	77.97	77.68	85.06	100	78.16	79.30	75.72	75.22	74.43
Cr	79.13	80.29	79.71	76.95	78.16	100	83.67	78.84	77.78	76.66
Tr	83.67	84.55	84.26	78.36	79.30	83.67	100	83.97	77.51	77.55
El	77.68	79.42	79.71	75.36	75.72	78.84	83.97	100	73.31	72.25
As	78.53	78.53	77.65	75.73	75.22	77.78	77.51	73.31	100	86.67
Sc	75.36	75.94	74.78	75.50	74.43	76.66	77.55	72.25	85.67	100

Ma- *M. anisopliae*; Mr- *M. robertsii*; Mac- *M. acridum*; Bb- *B. bassiana*; Cm- *C. militaris*; Tr- *T. reesei*; El- *E. lata*; Sa- *S. avermilitilis*; Sc- *S. coelicor*. As sequências utilizadas foram às mesmas da Figura 13. Quanto mais próximo de 100, maior a similaridade compartilhada pelas sequências.

Eutypa lata foi o único fungo, não pertencente à ordem Hypocreales, com um ortólogo relacionado encontrado em nossas buscas utilizando o BLAST. Pertencente à ordem Xylariales esse ascomiceto é comumente conhecido como uma fitopatógeno de vinhedos (Blanco-Ulate, Rolshausen e Cantu, 2013). Um possível evento de THG pode explicar a origem deste gene, porém a real natureza permanece especulativa. Futuros trabalhos que explorem a origem evolutiva deste gene e sua importância na patogênese de plantas e no ciclo de vida do fungo devem esclarecer sua origem. *Epichloë festucae*, um fungo simbiote de plantas (Schardl, 2001), da família *Clavicipitaceae* não apresentou ortólogos em nossa análise, sugerindo que o estilo de vida possa ser determinante na manutenção deste gene no genoma do fungo.

O único ortólogo de *chimaD1* com estudos mais detalhados em relação a sua função, é o gene *Bbchit1* de *B. bassiana*. A superexpressão de *Bbchit1* facilitou a infecção de artrópodes pelo fungo (Fan, Fang, *et al.*, 2007; Fan, Zhang, *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2010). Além disso, a expressão heteróloga de *Bbchit1* em plantas aumentou à resistência a infecção por fungos micoparasitas (Jia, *et al.*, 2010). Em *Trichoderma*, este gene está, hipoteticamente, relacionado ao micoparasitismo e a degradação de quitina (Ubhayasekera e Karlsson, 2012). Em *T. asperellum* um

ortólogo foi positivamente regulado, quando o fungo foi confrontado com o fitopatógeno *Rhizoctania solani* (Viterbo *et al.*, 2002). Resultado semelhante foi encontrado em estudos de expressão de *Clonostachys rosea* quando o fungo foi confrontado com *Botryotinia fuckeliana* (Mamarabadi *et al.*, 2008). Em *M. anisopliae* estudos medindo a expressão de *chimaD1* demonstraram que esse gene é mais expresso em condições ligadas a degradação de quitina e infecção do hospedeiro (Junges *et al.*, submetido). Os resultados em conjunto indicam que *chimaD1* e seus ortólogos podem ter importância em processos de nutrição em fungos. Assim como seus ortólogos, MaChiMaD1 apresentam um peptídeo sinal predito, indicando uma provável secreção (Junges *et al.*, submetido).

Tendo sido purificada a partir de extratos de *B. bassiana*, não há indicativos que a proteína Bbchit1 seja glicosilada neste fungo (Fang *et al.*, 2005). A expressão heteróloga de Bbchit1 em *E. coli*, uma bactéria que não possui maquinaria de glicosilação também reteve sua atividade, indicando que muito provavelmente esta proteína não sofre modificações deste tipo (Fan, Zhang, *et al.*, 2007). Embora algumas predições tenham indicado sítios de glicosilação em MaChiMaD1, baseado em trabalhos com ortólogos é possível supor que esta proteína não é glicosilada.

5.1.2 Análises *in silico* da ENGase MaEng18B

Ortólogos da ENGase MaEng18B foram caracterizados em *T. atroviride* (Eng18B) e *N. crassa* (gh18-10) (Figura 14). Diferindo das outras proteínas do subgrupo das ENGases (MaEng18A e MaEng18C), MaEng18B e seus ortólogos já caracterizados não possuem peptídeo sinal, sugerindo uma atividade citosólica. Embora, vias de secreção não convencional podem ser utilizadas na secreção de proteínas, nenhum trabalho com ENGases da família GH18 descreveu ortólogos de MaEng18B no meio extracelular. A deleção do gene *Eng18B* acarretou em alterações morfológicas e um reduzido crescimento de *T. atroviride*. Porém tal mutante foi menos suscetível a agentes estressores (NaCl, cafeína e SDS), e uma maior produção de esporos foi observada. Também foi relatada, uma diminuição na atividade antagonística do fungo quando confrontado com *B. cinerea* (Dubey *et al.*, 2012). Resultados similares foram observados quando o produto funcional de *gh18-10*, em *N. crassa*, foi abolido (Tzelepis *et al.*, 2012). Ambos os mutantes apresentaram uma redução na secreção de proteínas.

Em animais e plantas, ENGases da família GH85 integram a rota de degradação de proteínas mal formadas (ERAD: *Endoplasmic-reticulum associated protein degradation*). Por não apresentarem peptídeo sinal ou âncoras-GPI (com uma provável atividade no citosol), foi sugerido que as ENGases da família GH18, como MaEng18B, teriam envolvimento semelhante, uma vez que não há ENGases da família GH85 em fungos filamentosos nem PNGases funcionais (como visto abaixo). Recentemente os genes *Eng18A* (ortólogo de *MaEng18C* e *MaEng18A*) e *Eng18B* de *T. atroviride* foram expressos de forma heteróloga em uma cepa de *S. cerevisiae* defeituosa na rota do ERAD. A expressão *Eng18B* foi capaz de complementar a cepa mutante de *S. cerevisiae*, reestabelecendo a rota do ERAD, fortaleceram a hipótese do envolvimento destes genes com esta via (Tzelepis, G. et al., 2014).

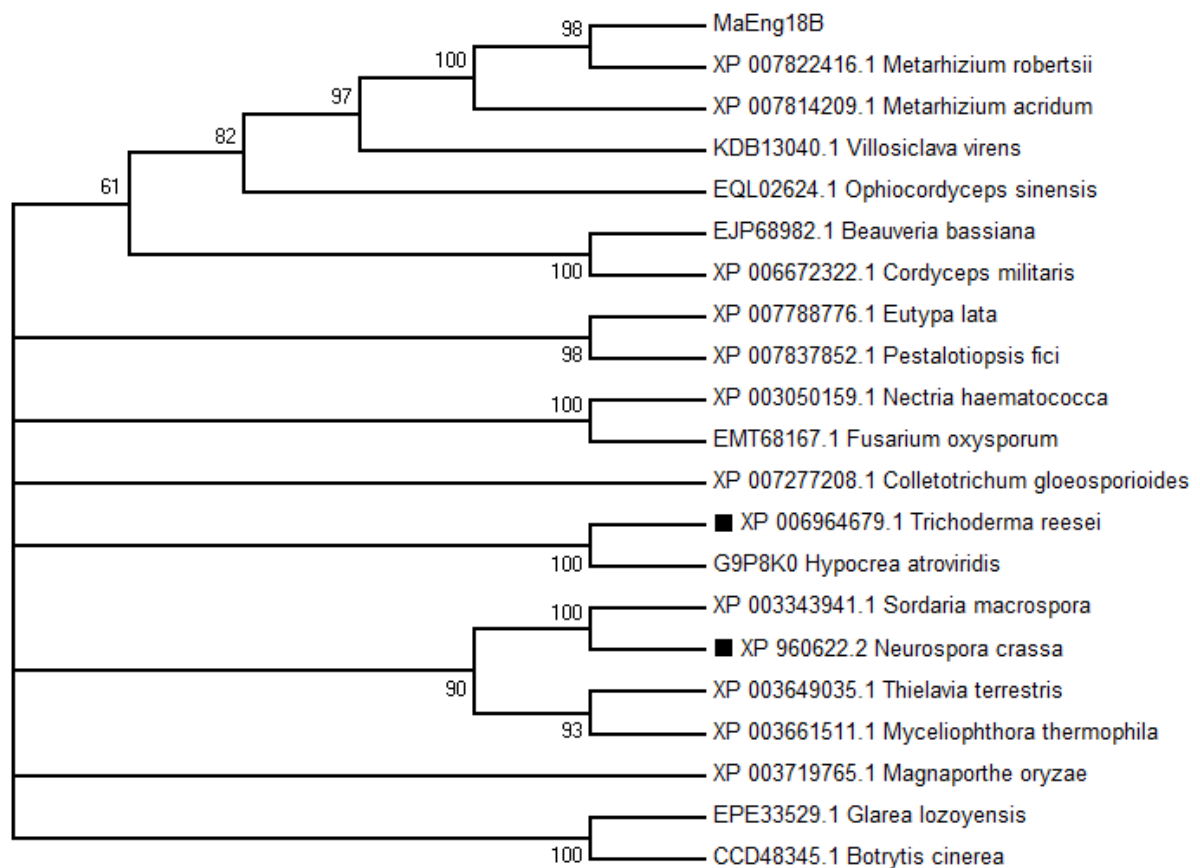


Figura 14: Árvore filogenética agrupando ortólogos da ENGase MaEng18B. *Bootstrap consensus tree*, obtida a partir do método de máxima verossimilhança com 1000 reamostragens. As sequências dos ortólogos já caracterizados (*Eng18B* e *gh18-10*) identificadas com (■), compartilhando 66 e 59% de identidade com *MaEng18B*.

5.1.2.1 PNGase de *M. anisopliae*

Em eucariotos a montagem e enovelamento de proteínas que serão secretadas tomam lugar no RE (Spiro, 2002). Enquanto proteínas com uma correta montagem seguem até o seu destino final, proteínas que por algum motivo falham, serão alvo de degradação. Proteínas N-glicosiladas, com algum defeito em seu enovelamento, sofrem ação de glicosidases, manosidases, ENGases e PNGases, hidrolisando o N-oligossacarídeo ligado a sua cadeia, em subunidades menores, antes que ele seja encaminhado para o lisossomo. Fungos filamentosos como *T. atroviride*, a princípio possuem uma rota não funcional, uma vez que sua PNGase possui uma mutação na tríade catalítica (Cys, His, Asp), onde cisteína foi substituída por valina (Tzelepis, G. *et al.*, 2014). Esta mutação também está presente em *M. anisopliae* (Figura 15).

	*	240	*	260	*
Ma	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 266
Mr	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 266
Mac	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 266
Bb	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 256
Ta	:	SACGALRVELYRCSAESC	GTIERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 254
Vv	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 267
Os	:	SARGALRVELYRCSAQNCGA	VYERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 259
Cp	:	SACGALRVELYRCSAQNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 269
Nh	:	SACGALRVELYRCSAHNCGA	YERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 250
Fv	:	SACGALRVELYQCSAQNCGA	FERFPRYGDVW	LLQTRRGRVGEWA	: 247
		SACGALRVELYrCSA	CGa5ERFPRYgDVWr	LLQTRRGRVGEWA	

Figura 15: Sequência de aminoácidos da tríade catalítica das PNGases de diferentes fungos.

Mutação, que supostamente inativaria a proteína, uma troca de cisteína por valina é conservada em fungos da ordem Hypocreales, estando destacada em vermelho. Ma- *M. anisopliae*; Mr- *M. robertsii* (XP_007821355.1); Mac- *M. acridum* (XP_007811883.1); Bb- *B. bassiana* (EJP65848.1); Ta- *T. atroviride* (EHK39831.1); Vv- *V. virens* (KDB15503.1); Os- *O. sinensis* (EQL03505.1); Cp- *C. purpurea* (CCE28184.1); Nh- *N. haematococca* (XP_003054598.1); Fv- *F. verticillioides* (EWG36176.1).

Embora não funcional essa proteína é bem conservado em diferentes espécies da ordem Hypocreales, com mais de 70% de similaridade de aminoácidos (Tabela 3). Tendo em vista a flexibilidade dos genomas, é questionável porque um gene, teoricamente não funcional, é tão bem conservado em diversos organismos. Essa conservação pode indicar que o produto deste gene pode, hipoteticamente, ter outra função.

Tabela 3: Matriz de Identidade de aminoácidos das PNGases de diferentes fungos da ordem Hypocreales.

Organismo	Ma	Mr	Mac	Bb	Ta	Vv	Os	Cp	Nh	Fv
Ma	100.	99.79	99.36	80.57	76.21	87.02	79.57	83.62	81.94	79.91
Mr	99.79	100	99.58	80.57	76.43	87.23	79.78	83.83	82.17	80.14
Mac	99.36	99.58	100	80.57	76.87	86.81	80.00	83.40	82.39	80.14
Bb	80.57	80.57	80.57	100	76.48	77.75	76.12	76.04	81.21	79.46
Ta	76.21	76.43	76.87	76.48	100	76.26	74.78	74.40	81.12	78.08
Vv	87.02	87.23	86.81	77.75	76.26	100	75.43	80.21	79.95	78.60
Os	79.57	79.78	80.00	76.12	74.78	75.43	100	74.19	79.55	77.40
Cp	83.62	83.83	83.40	76.04	74.40	80.21	74.19	100	77.75	75.56
Nh	81.94	82.17	82.39	81.21	81.12	79.95	79.55	77.75	100	88.76
Fv	79.91	80.14	80.14	79.46	78.08	78.60	77.40	75.56	88.76	100

Ma- *M. anisopliae*; Mr- *M. robertsii* (XP_007821355.1); Mac- *M. acridum* (XP_007811883.1); Bb- *B. bassiana* (EJP65848.1); Ta- *T. atroviride* (EHK39831.1); Vv- *V. virens* (KDB15503.1); Os- *O. sinensis* (EQL03505.1); Cp- *C. purpurea* (CCE28184.1); Nh- *N. haematococca* (XP_003054598.1); Fv- *F. verticillioides* (EWG36176.1). Quanto mais próximo de 100, maior a similaridade compartilhada pelas sequências.

5.1.3 Análises *in silico* das ENGases MaEng18A e MaEng18C

O produto de *Eng18A*, Endo T, foi a primeira ENGase a ser caracterizada no fungo *T. reesei* (Stals et al., 2010). *M. anisopliae* apresenta dois ortólogos para o gene *Eng18A* (*MaEng18C* e *MaEng18A*) (Figura 16). Ambas as proteínas codificadas por estes genes contêm um peptídeo sinal predito, indicando uma possível função extracelular. Dados obtidos por cristalografia de Raio-X de Endo T e pela expressão heteróloga do gene *Eng18A* de *T. atroviride* em *S. cerevisiae*, indicam que esta proteína é N-glicosilada (Stals et al., 2012; Tzelepis, G. et al., 2014). Em *M. anisopliae* esses sítios são conservados, indicando que provavelmente, as proteínas também são glicosiladas. Curiosamente, Endo T também é deglicosilada em seus sítios de glicosilação, devido a uma provável atividade de auto-deglicosilação exercida pela proteína (Stals et al., 2012).

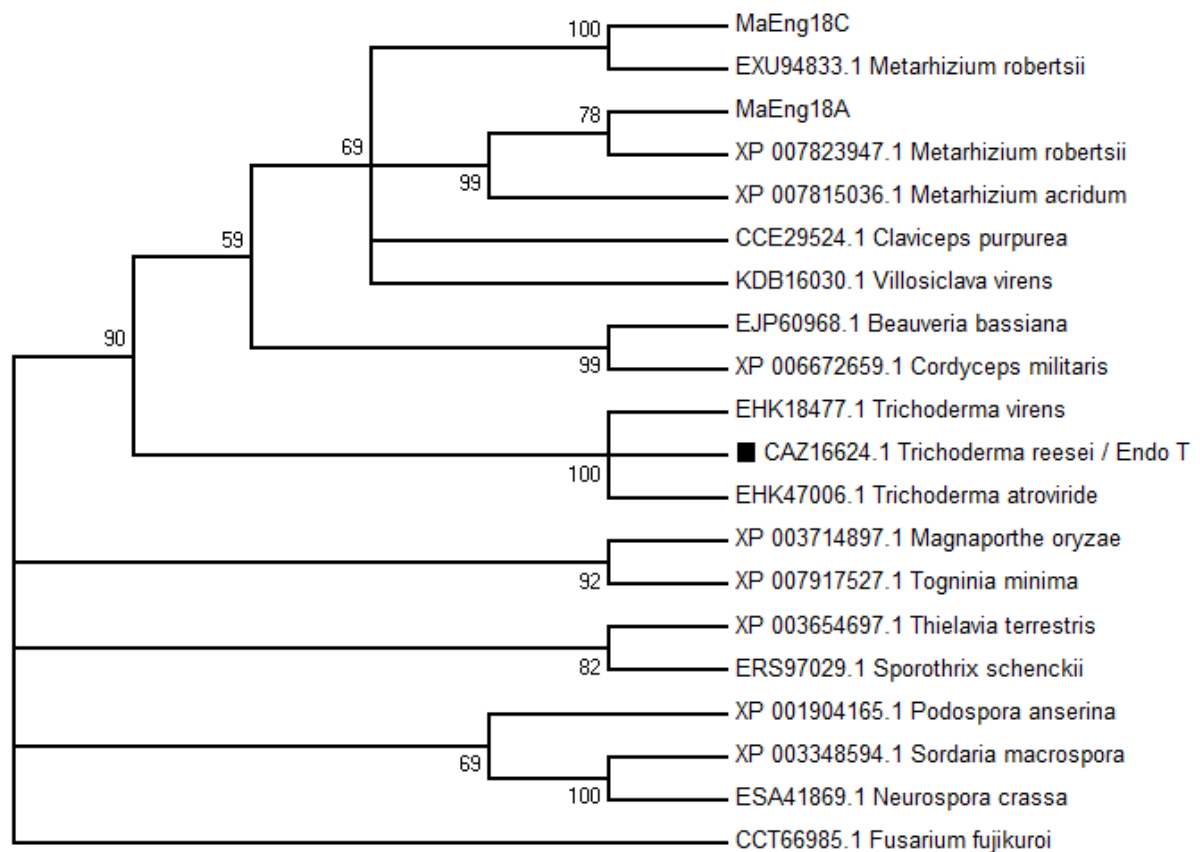


Figura 16: Árvore filogenética agrupando ortólogos de MaEng18A e MaEng18C. *Bootstrap consensus tree*, obtida a partir do método de máxima verossimilhança com 1000 reamostragens. A sequência de Endo T, já caracterizada em *T. reesei* (■), possuindo 57% e 63% de identidade com MaEng18C e MaEng18A.

Embora a deglicosilação em *Trichoderma* tenha sido descoberta graças a trabalhos com celulases, a princípio, qualquer proteína N-glicosida pode sofrer deglicosilação. Indicando que as ENGases em fungos podem desempenhar um papel essencial em seus ciclos de vida. Enquanto a maioria dos fungos com genoma sequenciado possui duas ENGases, uma citosólica e outra extracelular, *M. anisopliae* e *M. robertsii* apresentam três genes que codificam estas enzimas, dois deles possuindo um peptídeo sinal predito. Tendo em vista que *M. acridum*, um fungo entomopatogênico hospedeiro-específico, só possui uma cópia, os dois parálogos identificados em *M. anisopliae* podem estar correlacionados a diversidade de hospedeiros que o fungo pode infectar. Correlação semelhante é observada nos genes que levam a produção de destruxinas (Wang, *et al.*, 2012). *M. acridum* também possui um menor número de quitinases quando comparado com *M. anisopliae* e *M. robertsii* (Figura 8).

Análises da expressão de *MaEng18C* indicam que este gene é mais expresso em MCC (um meio rico), do que em relação as outras condições testadas (conídio, apressório, blastosporo, MM + GlcNAc, MM + quitina, autólise e crescimento na cutícula de *R. microplus*). Uma expressão basal também foi observada em condições de autólise, degradação de quitina e infecção do hospedeiro, indicando que essa proteína pode estar deglicosilando proteínas chaves, tanto para a captação de nutrientes do meio, como proteínas do hospedeiro (Junges *et al.*, submetido). Até o momento apenas ENGases fúngicas com a capacidade de deglicosilar N-glicosilações ricas em manose foram identificadas, não atuando sobre outros oligossacarídeos (i.e. híbridos e complexos). Enquanto algumas ENGases bacterianas não são tão restritivas, podendo utilizar substratos com diferentes composições. A presença de mais de um gene com provável atividade extracelular em *M. anisopliae*, pode estar correlacionada com o maior número de substratos presentes nos hospedeiros invertebrados parasitados pelo fungo. Podendo estes genes estar, hipoteticamente, relacionados com a infecção e deglicosilação de proteínas não-próprias, de maneira semelhante às ENGases da família GH18 de bactérias patogênicas. Futuros trabalhos que avaliem como a capacidade de deglicosidase destas proteínas afetam a resposta imune do hospedeiro são de interesse.

5.2 Cassetes de Deleção para a construção de Mutantes Funcionais.

Uma das abordagens para a determinação da função de genes específicos no processo de infecção é a inativação de sua atividade e posterior análise do fenótipo gerado. Tais mutantes são um dos primeiros passos na caracterização destes genes em fungos entomopatogênicos. Assim iniciamos a construção de mutantes funcionais para os genes *chimaD1*, *MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C*, para verificar a sua possível participação em processos no ciclo de vida e na infecção dos hospedeiros por *M. anisopliae*.

Os vetores binários pPZP201BK- Δ ChimaD1 e pPZP201BK- Δ MaEng18C, assim como o vetor pCR2.1- Δ MaEng18A, foram construídos neste trabalho. As construções foram confirmadas por PCR e clivagem de sítios internos, tanto das regiões flangeadoras como da marca de resistência. Estando as clivagens apresentadas nas Figuras 17, 18 e 19. A estratégia de construção dos vetores se mostrou válida, assim como em outros trabalhos em andamento de nosso grupo. A

metodologia de PCR de fusão vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa, de forma a otimizar a clonagem e construção de *cassetes* de deleção (Yu *et al.*, 2004). Antes da publicação desta metodologia, a construção era procedida em diversas etapas de clonagem, aumentando a possibilidade de erros e tempo necessário para a obtenção. Embora seja possível, a clonagem dos *cassetes* diretamente no vetor pPZP201BK, empregamos uma etapa a mais na rotina de construção, devido a dificuldades de manipulação do vetor binário. A clonagem dos *cassetes* no vetor pCR2.1-TOPO® facilita assim, a manipulação das sequências nucleotídicas, providenciando também um maior número de cópias do *cassete* para futuras etapas de clonagem. Não se fazendo necessária a amplificação do *cassete* com oligonucleotídeos contendo sítios de enzimas de restrição nas extremidades, uma vez que este vetor comercial utiliza a reação da topoisomerase do vírus *vaccinia*.

Recentemente, diversas estratégias com o objetivo de minimizar o tempo necessário das metodologias clássicas, e tão eficientes como metodologias comerciais têm sido publicadas (Stevenson *et al.*, 2013). Uma dessas técnicas promissoras, *sequence- and ligation independente cloning* (SLIC) (Jeong *et al.*, 2012) foi testada sem sucessos por nosso grupo. Outra metodologia empregada com bastante sucesso, à recombinação *in vivo* utilizando *E. coli*, encontrou barreiras técnicas para sua utilização (Parrish *et al.*, 2004). A recombinação comercial *in vitro* utilizando In-Fusion™ (Clontech, Japão), também é uma alternativa, tendo apresentado bons resultados, e sendo mais barata que outras metodologias comerciais como os vetores Gateway®.

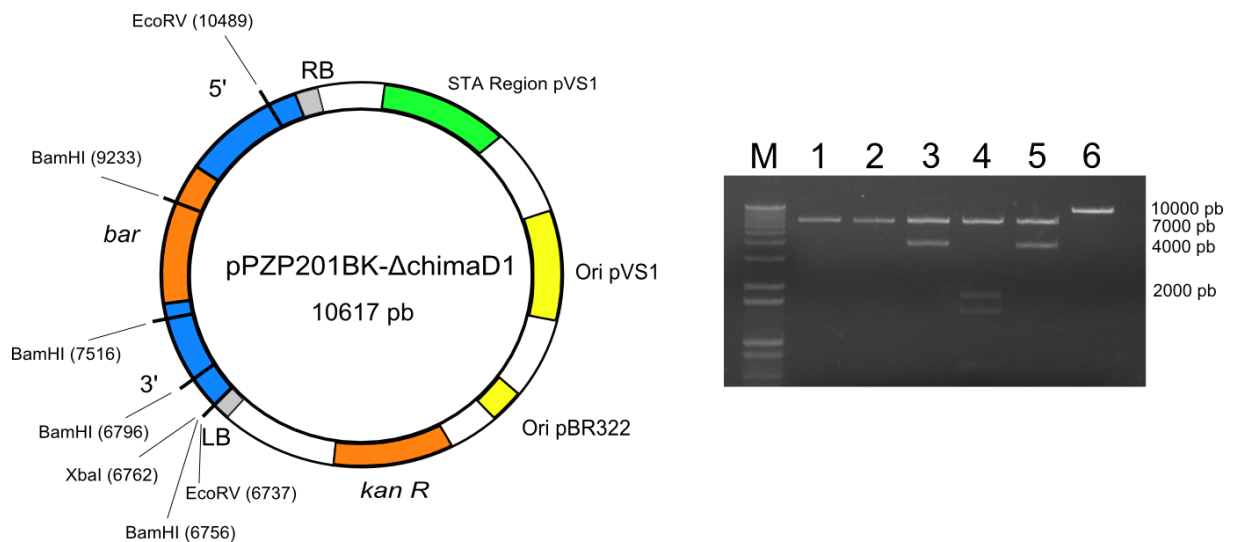


Figura 17: Clivagens de confirmação do vetor pPZP201BK-ΔChimaD1. O vetor pPZP201BK foi utilizado como controle. **M:** Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); **1,2:** pPZP201BK; **3,4,5,6:** pPZP201BK-ΔChimaD1. **1:** XbaI; **2:** BamHI; **3:** EcoRV; **4:** BamHI; **5:** XhoI + PstI; **6:** XbaI.

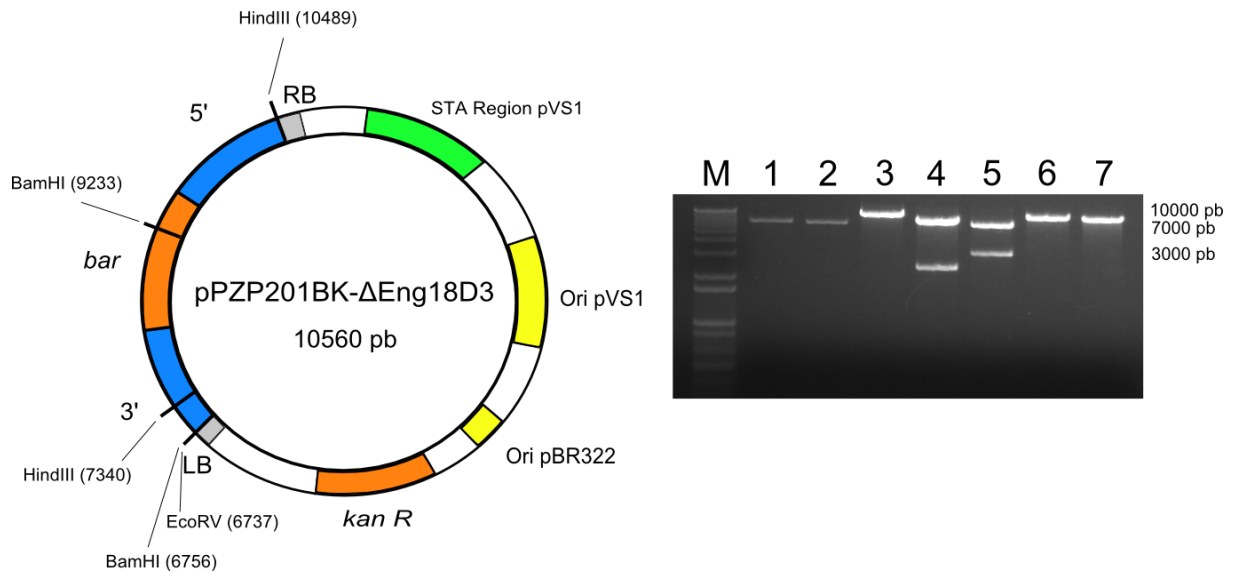


Figura 18: Clivagens de confirmação do vetor pPZP201BK-ΔMaEng18C. O vetor pPZP201BK foi utilizado como controle. **M:** Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); **1,2:** pPZP201BK; **3,4,5,6,7:** pPZP201BK-ΔChimaD1. **1:** XbaI; **2:** BamHI; **3:** EcoRV; **4:** BamHI; **5:** HindIII; **6:** XbaI; **7:** PstI.

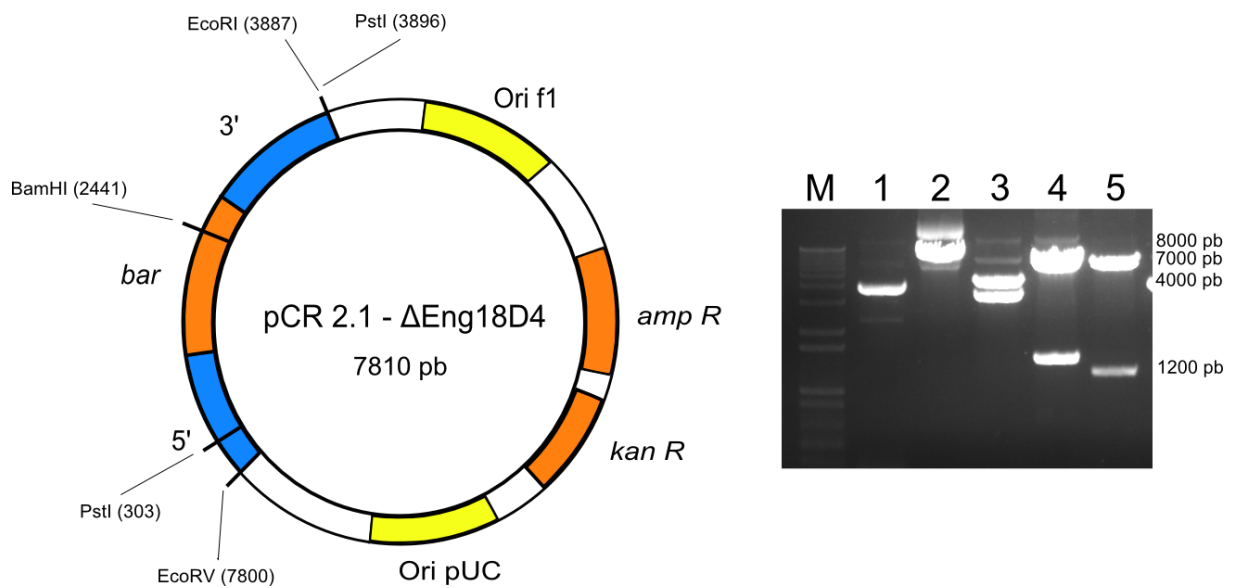


Figura 19: Clivagens de confirmação do vetor pCR2.1-ΔMaEng18A. O vetor pCR 2.1-TOPO foi utilizado como controle. **M:** Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); **1:** pCR 2.1-TOPO; **2,3,4,5:** pCR2.1-ΔMaEng18A. **1:** Sac; **2:** Sac; **3:** EcoRI; **4:** PstI; **5:** BamHI.

O cassette ΔMaEng18B, de 3.880 pb, foi submetido a diferentes metodologias de clonagem, em diferentes vetores, variando a linhagem bacteriana de *E. coli* utilizada, na tentativa de cloná-lo. Todas as tentativas foram infrutíferas, levantando a hipótese de uma possível toxicidade do constructo em *E. coli*. Há vários relatos na

literatura de genes tóxicos para *E. coli* (Kimelman *et al.*, 2012). Uma das alternativas para contornar o problema é a utilização de outros microorganismos. Protocolos para clonagem e recombinação em *S. cerevisiae* e *P. pastoris* estão em constante desenvolvimento (Wang *et al.*, 2012). Assim como a clonagem e expressão em *Lactococcus lactis*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Streptomyces* têm sido benéficas em determinados casos (Chen, 2012). Também existem diferentes estratégias e linhagens para suplantam a expressão de genes e sequências tóxicas em *E. coli* (Saída *et al.*, 2006). *A. tumefaciens* também pode ser utilizada, mas a utilização deste microorganismo é dificultada pela ausência de protocolos eficientes e de variedades de linhagens para isso. Não obstante, um conjunto de estratégias deverá ser utilizado para a construção deste vetor.

5.3 Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) e Confirmação dos Mutantes funcionais para o gene *chimaD1*.

Diversos métodos de transformação já foram desenvolvidos para fungos filamentosos. O método de ATMT é um dos métodos que apresenta melhores resultados e facilidade de manipulação (Frandsen, 2011). Um das dificuldades na implementação desta metodologia é a necessidade de padronização da técnica, para cada novo gênero fúngico, tendo em vista sutis diferenças na eficiência (Staats *et al.*, 2007). O método desenvolvido em nosso laboratório se mostrou eficaz, quando o vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1 foi submetido a ATMT. Cento e cinquenta mutantes foram selecionados provenientes da transformação, sendo estes analisados por PCR na busca de eventos de correta recombinação homóloga.

A maior desvantagem da aplicação de métodos de genética reversa em fungos filamentosos é o pequeno número de mutantes com a correta recombinação homóloga desejada, em relação aos mutantes com recombinação ectópica. Eventos de transformação na maioria dos fungos filamentosos apresentam uma taxa de recombinação homóloga extremamente baixa, variando de 1-2%, dependendo do *locus*, do gene a ser interrompido e do gênero do fungo (Frandsen, 2011). A integração de DNA exógeno em fungos é, principalmente, dirigida pela via de recombinação não-homóloga (NHEJ : *non-homologous end-joining*), explicando assim o baixo sucesso observado (Tadashi, Masuda e Koyama, 2006). Outra dificuldade inerente à técnica de ATMT é a diferença de taxa de crescimento dos mutantes com correta recombinação homóloga e recombinação ectópica. Caso a abolição do produto do

gene de interesse, afete significativamente o desenvolvimento do mutante, seu crescimento pode ser sobreposto por outro mutante, dificultando sua recuperação.

Embora os métodos clássicos de extração de DNA por fenol-cloróformio produzam excelentes resultados em fungos filamentosos, a extração por esses métodos se torna inviável para um grande número de amostras, dado o custo e tempo de obtenção. Para a primeira confirmação por PCR, um fragmento interno que seria substituído caso a correta recombinação homóloga acontecesse foi amplificando, e aqueles mutantes onde não houve amplificação foram selecionados (Figura 20). Para tanto foi escolhido o método de extração de DNA por micro-ondas, um método alternativo, mais rápido que os clássicos, e menos custoso (Ferreira e Glass, 1996). Nós utilizamos um PCR “negativo” devido à ausência de controles e as limitações do DNA extraído pelo método de micro-ondas. Embora este método permita a análise de um grande número de amostras, o DNA obtido apresenta um grande número de contaminantes, como nucleases, proteases e polissacarídeos que podem interferir com a reação de PCR, não permitindo a amplificação de fragmentos muito grandes (Schrader *et al.*, 2012). Tendo em vista, este maior contratempo, esse PCR foi repetido três vezes, sendo eliminados, a cada etapa, aquelas amostras que apresentavam amplificação, restando dez mutantes. Seis mutantes dos dez foram reconfirmados utilizando um PCR Multiplex (Figura 21), e após, analisados pela metodologia de *Southern blotting*, confirmando a inserção do cassete de deleção e interrupção do gene *chimaD1* (Figura 22).

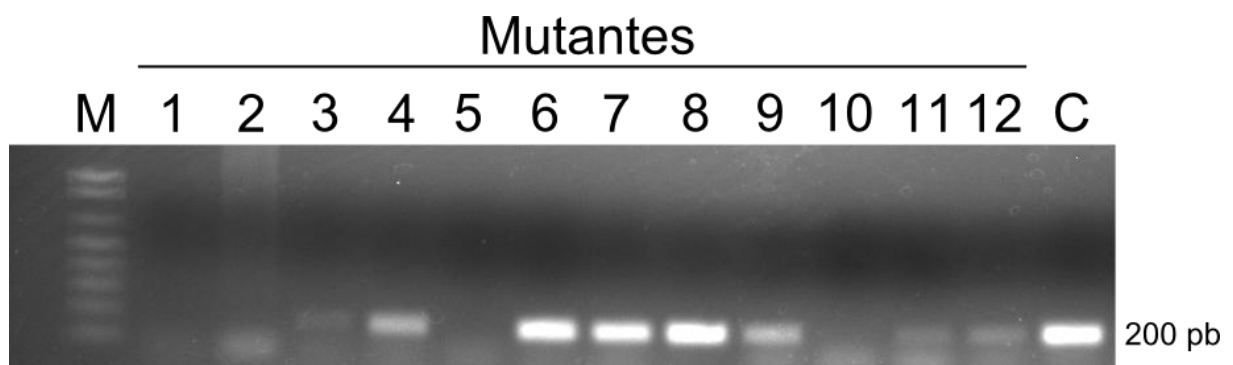


Figura 20: PCR de confirmação dos mutantes. A fim de avaliar a correta recombinação homóloga do cassete Δ ChimaD1 nós utilizamos a metodologia de PCR, amplificando uma região interna de 200 pb que seria substituída se o *locus* selvagem estivesse interrompido. Em 1, 5 e 10 podemos ver possíveis mutantes **M** – Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (InvitrogenTM); **(1-12)** – Mutantes; **C** – Controle positivo para a amplificação, utilizando DNA da linhagem selvagem E6.

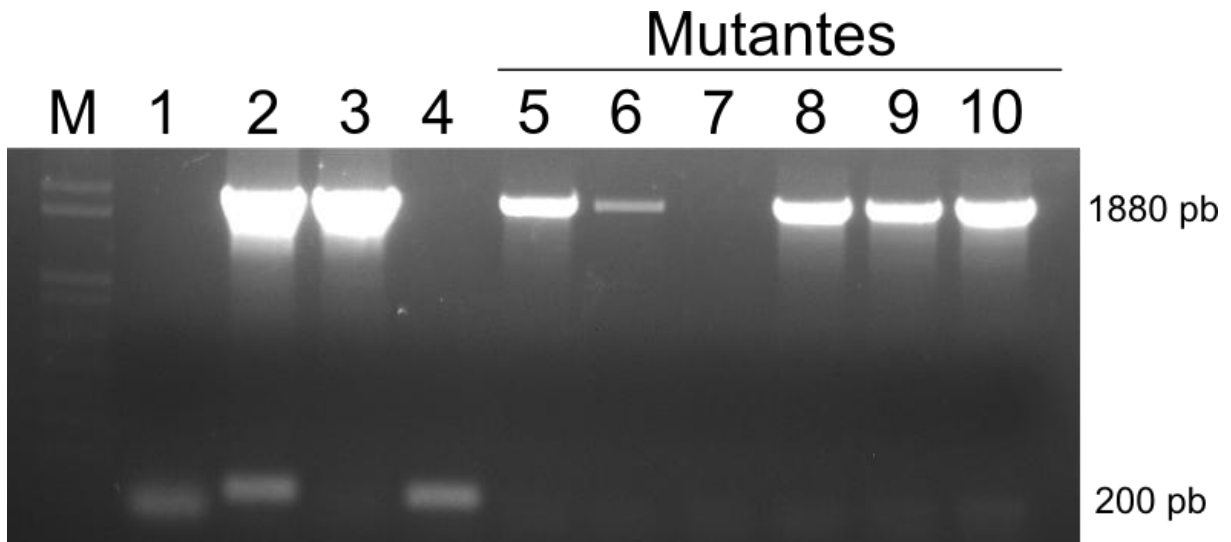


Figura 21: PCR Multiplex de confirmação dos mutantes. Como mais uma forma de confirmação, os mutantes selecionados a partir da metodologia apresentada na Figura 20 foram submetidos à metodologia de PCR, amplificando simultaneamente, dois fragmentos: A região interna de 200 pb utilizada como confirmação na figura anterior e o gene *bar* de 1880 pb. A ausência da banda de 200 pb e presença do amplicon de 1880 pb indicam um possível mutante funcional (5,6,8,9). **M** – Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); **2** – DNA da linhagem selvagem E6 + pPZP201BK- Δ ChimaD1; **3** - pPZP201BK- Δ ChimaD1; **4** – DNA da linhagem selvagem E6; **(5-10)** - Mutantes.

O mutante Δ ChimaD1 não apresentou alterações significativas de crescimento, morfologia e produção de conídios, em análises prévias. Também não foram observadas alterações no perfil de suscetibilidade a agentes estressores como NaCl, KCl, H₂O₂ e SDS. Embora esses resultados ainda careçam de confirmação, por isso não estão dispostos, eles indicam que MaChiMaD1, pode ter um maior envolvimento em processos de nutrição, em relação a outros processos.

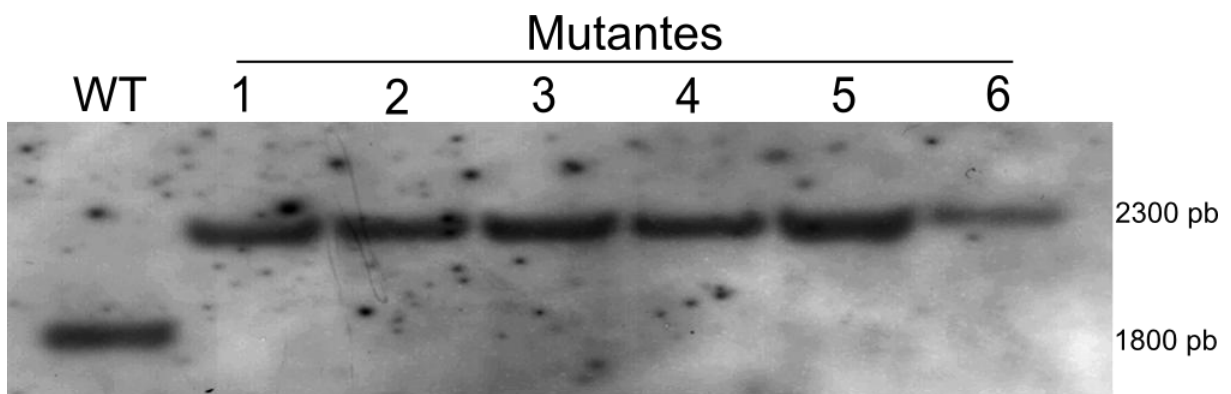


Figura 22: Southern blotting para seis mutantes selecionados através da análise prévia por PCR. Autorradiografia após a hibridização. **(WT)** – DNA da linhagem selvagem E6; **(1–6)** – DNA dos clones transformantes. Nós utilizamos como sonda o fragmento 3' do *cassette* de deleção.

A metodologia de construção dos mutantes utilizada neste trabalho tenha sido exitosa, com um mutante funcional corretamente construído, e mais dois em

processo. Diversas ferramentas devem ser exploradas em trabalhos futuros, permitindo acelerar e diminuir os custos das construções. Algumas estratégias como os mutantes para os genes *ku70* e *ku80*, interrompendo a NHEJ e induzindo uma maior recombinação homóloga (Tadashi, Masuda e Koyama, 2006), e ferramentas como o RNA de interferência (RNAi) (Liu, Cao e Xia, 2010) estão em desenvolvimento por nosso grupo, e outras metodologias também podem ser exploradas a fim de facilitar estas construções.

5.4 Marca de Resistência a Chlorimuron-etil

A construção de mutantes funcionais, estratégia utilizada neste trabalho, tem sido uma das principais metodologias no estudo da interação entre fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros. Para facilitar a manipulação gênica, múltiplas marcas de seleção são necessárias, sendo a complementação do mutante deletério uma importante prova de conceito.

A seleção mais utilizada em *M. anisopliae* é a resistência a glifosinato de amônio, um herbicida de amplo espectro, que interfere com a síntese de glutamina (Inglis *et al.*, 2000; Nakazato *et al.*, 2006). Enquanto o gene *bar* é uma marca dominante para transformação de fungos filamentosos, outros antibióticos possuem uma atividade tóxica restrita a determinadas espécies e linhagens. Um exemplo é a suscetibilidade variável de linhagens de *M. anisopliae* a Benomil e Higromicina, outras duas drogas já empregadas na transformação de *M. anisopliae* (Staats, comunicação pessoal). A linhagem E6, modelo em nosso laboratório é resistente a estes dois antibióticos, dificultando assim a complementação de nossos mutantes funcionais. Lin e colaboradores (2011) relataram a resistência de *Metarhizium roberstii* ao fungicida Chlorimuron-etil, quando inserida a este, uma sequência exógena oriunda de *Magnaporthe grisea*, o gene *sur* (Lin, Wang e Wei, 2011). Desde então, em conjunto com o gene *bar*, essas marcas tem sido amplamente usadas na construção de mutantes nulos e na complementação dos mesmos (Huang *et al.*, 2014).

A fim de padronizar a marca de resistência para Chlorimuron-etil, (i.e. transformando o gene *sur* na linhagem E6 e avaliando a resistência desta linhagem ao antibiótico) nós construímos o vetor pPZP201BK-Sur (Figura 23). A esse vetor foi acrescentado o gene *bar* seguindo a metodologia descrita por (Green e Sambrook,

2012) para clonagem de produtos de PCR, gerando o vetor pPZP201BK-Sur/Bar, sendo este um controle para a ATMT (Figura 23). Esta metodologia de clonagem se mostrou eficiente no único evento de transformação realizado, embora a taxa de sucesso tenha sido extremamente baixa.

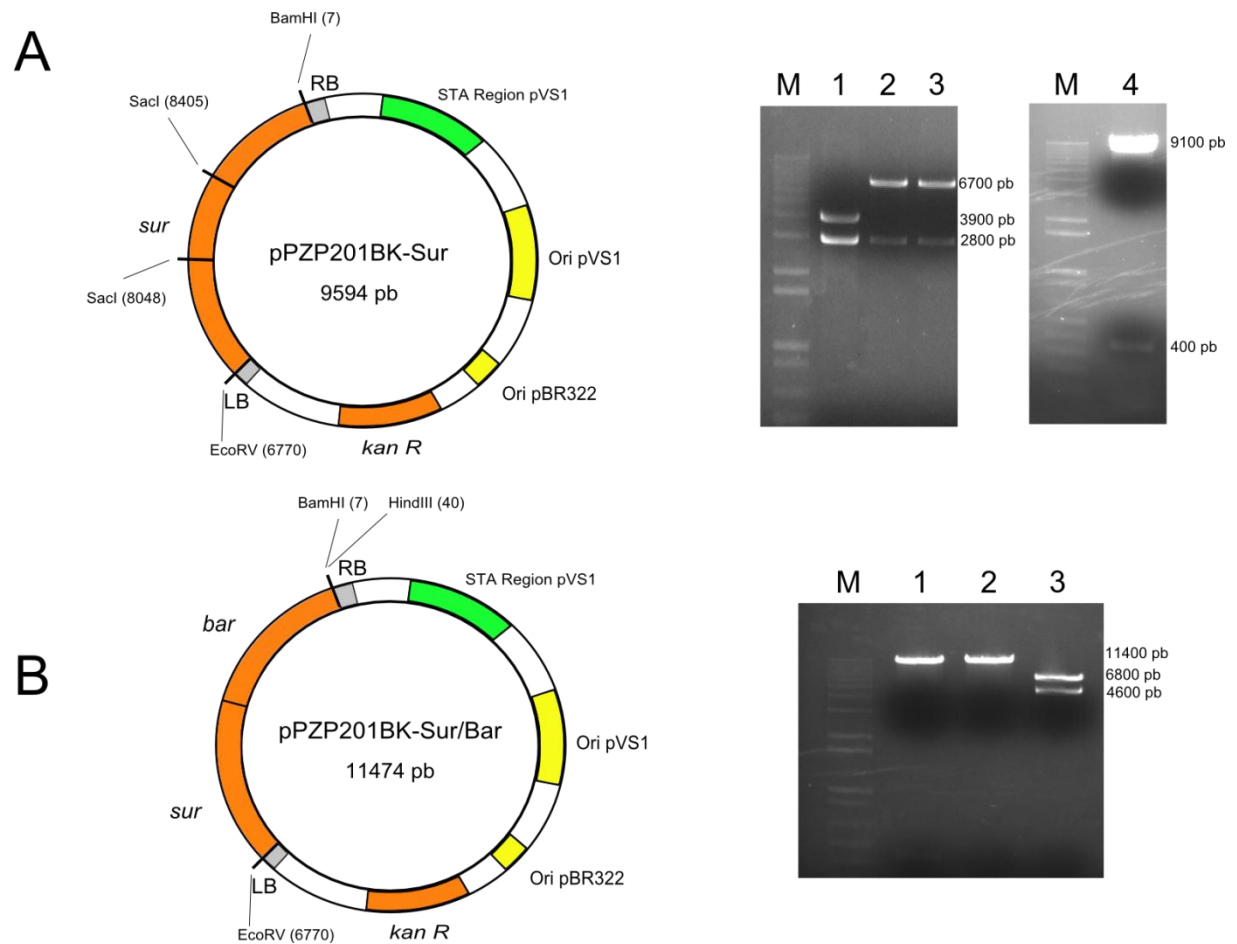


Figura 23: Clivagens de confirmação dos vetores pPZP201BK-Sur (A) e pPZP201BK-Sur/Bar (B). (A) M: Marcador de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (InvitrogenTM); 1: pCR 2.1-Sur; 2,3,4: pPZP201BK-Sur. Os vetores foram clivados com *BamHI* e *EcoRV* (1,2,3) e *SacI* (5). (B) 1,2,3: pPZP201BK-Sur/Bar. XbaI; 2: *BamHI*; 3: *EcoRV*; 4: *BamHI*; 5: *XhoI* + *PstI*; 6: *XbaI*.

Uma vez confirmada a utilidade do gene *sur*, como marca de resistência na linhagem E6 de *M. anisopliae*, será possível a complementação dos mutantes funcionais descritos neste trabalho e, em construção futuras. O vetor pPZP201BK-Sur conserva boa parte do sitio múltiplos de clonagem do vetor pPZP201BK, permitindo a clonagem de fragmentos utilizando diferentes endonucleases. Tendo em vista a utilização de oligonucleotídeos que amplificam 1.000 pares de bases à jusante e a montante da região codificadora na construção de mutantes funcionais, abrigando putativamente as regiões promotoras e terminadoras para estes genes. Esses mesmos oligonucleotídeos podem ser utilizados na complementação dos

mutantes, amplificando, desde a região promotora até a terminadora, e clonando o produto de PCR em uma única etapa usando a metodologia descrita por Green & Sambrook (2012) para clonagem de produtos de PCR .

6 CONCLUSÕES

- Nossas análises filogenéticas atrelaram três genes da família GH18 de *M. anisopliae* com as recém-descobertas ENGases desta família. Com baixa similaridade de sequências com as ENGases bacterianas da família GH18, a atividade de deglicosilação catalisada por estas enzimas, é, provavelmente, proveniente de uma neofuncionalização das quitinases fúngicas, segundo a literatura.
- Nós relatamos, pela primeira vez, uma mutação, no motivo de ligação ao substrato SxGG. Tal mutação, uma troca de serina por metionina, em um motivo importante para ligação das quitinases ao substrato pode, em parte, explicar a ausência de atividade catalítica destas enzimas em relação à quitina.
- Diferindo de outros fungos, que apresentam, apenas uma ENGase citosólica e uma copia extracelular, *M. anisopliae* possui dois parálogos com peptídeo sinal predito. A presença destes dois genes pode estar correlacionada ao estilo de vida entomopatogênico de *M. anisopliae*.
- A ENGase citosólica, está putativamente envolvida com ERAD, substituindo, nesta via uma enzima com atividade de PNGase. Essa enzima apresenta uma mutação em seus sitio catalítico em fungos da ordem Hypocreales, que possivelmente elimina sua atividade. Curiosamente a PNGase de fungos desta ordem se encontra bastante conservada, em diversas espécies.
- O quarto gene analisado em nosso trabalho, embora filogeneticamente mais próximo das ENGases, do que de outras quitinases de *M. anisopliae*, é uma quitinase adquirida por transferência horizontal. Esse gene originário de uma bactéria do gênero *Streptomyces*, foi adquirido por um ancestral comum das famílias *Hypocreaceae*, *Clavicipitaceae*, *Bionectriaceae* e *Cordycipitaceae*, estando envolvido hipoteticamente em processos de nutrição em fungos micoparasitas e entomopatogênicos.
- A fim de melhor estudar a importância destes genes no ciclo de vida e infecção de *M. anisopliae*, cassetes de deleção foram construídos para os genes *chimaD1*, *MaEng18A*, *MaEng18B* e *MaEng18C* de modo a interromper estes gene por meio de um recombinação homóloga. O método de transformação escolhido via co-cultivo com a bactéria *A. tumefaciens*, exige

que estes *cassetes* sejam clonados em um vetor binário (pPZP201BK). Vetores binários para os genes *chimaD1* e *MaEng18C* foram corretamente construídos. Enquanto a construção de *MaEng18A* está em processo. A clonagem do *cassete* de deleção para *MaEng18B* enfrentou problemas, devido a uma possível toxicidade da construção.

- A transformação do vetor pPZP201BK- Δ ChimaD1 via ATMT, gerou 150 mutantes, tendo a metodologia de transformação se mostrado conveniente. Seis mutantes portavam o *locus* do gene *chimaD1* interrompido. Tais mutantes funcionais foram confirmados pela resistência destes ao glifosinato de amônio, por PCR e *Southern blotting*.

7 PERSPECTIVAS

Experimentos devem ainda ser realizados com as diversas construções ambicionadas por este trabalho.

- Explorar estratégias, que ainda devem ser debatidas, para a construção do vetor binário pPZP201BK- Δ MaEng18B;
- Clonar o *cassete* Δ MaEng18A no vetor binário pPZP201BK;
- Submeter a metodologia de ATMT a linhagem E6, utilizando os vetores pPZP201BK- Δ MaEng18A, pPZP201BK- Δ MaEng18B e pPZP201BK- Δ MaEng18C, pPZP201BK-Sur/Bar;
- Construção dos mutantes complementados com resistências a Chlorimuron etil para os quatro genes;

Os mutantes selecionados com correta recombinação homóloga serão submetidos a diferentes metodologias a fim de analisar as diferenças fenotípicas quando comparados com a linhagem selvagem. Dentre os ensaios previstos estão:

- Análise morfológica, taxa de crescimento e conidiação, produção de biomassa (Dubey *et al.*, 2012);
- Bioensaios contra o carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*) e a traça da cera (*Galleria mellonella*) (Wang, Typas e Butt, 2002; Arruda *et al.*, 2005);
- Ensaios de resistência ao estresse (Tzelepis *et al.*, 2012);
- Secreção de proteases (Nygren *et al.*, 2007);

- *RNase B band shift assay* (Ensaio para a detecção de atividade de deglicosilação) (Stals *et al.*, 2010);
- Atividade quitinolítica (Howard *et al.*, 2003).

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Vet Parasitol**, Mar 2014. ISSN 1873-2550.

ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1786-1795, Dec 2013. ISSN 0734-9750.

AGARWAL, S. et al. Identification of Mannose Interacting Residues Using Local Composition. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 9, Sep 2011. ISSN 1932-6203.

ALCAZAR-FUOLI, L. et al. Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 4, p. 418-429, Apr 2011. ISSN 1087-1845.

ALTSCHUL, S. F. et al. BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct 1990. ISSN 0022-2836.

ALVI, A. H. et al. Field evolved resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in Pakistan. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47309, 2012. ISSN 1932-6203.

APWEILER, R.; HERMIAKOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 4-8, DEC 6 1999 1999. ISSN 0304-4165.

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

ARRUDA, W. et al. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Exp Appl Acarol**, v. 37, n. 3-4, p. 231-44, 2005. ISSN 0168-8162.

BAGGA, S. et al. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159-169, Jan 2004. ISSN 0378-1119.

BARRAZA, A.; SÁNCHEZ, F. Trehalases: A neglected carbon metabolism regulator? **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 7, p. e24778, 07/01 2013.

BATEMAN, A.; BYCROFT, M. The structure of a LysM domain from E-coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 4, p. 1113-1119, Jun 2000. ISSN 0022-2836.

BEN-DOR, S. et al. Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 95-101, Feb 2004. ISSN 0959-6658.

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Biochemistry**. 6th Edition. New York: W H Freeman, 2006.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. *Metarhizium frigidum* sp nov.: a cryptic species of *M-anisopliae* and a member of the *M-flavoviride* complex. **Mycologia**, v. 98, n. 5, p. 737-745, Sep-Oct 2006. ISSN 0027-5514.

_____. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, Jul-Aug 2009. ISSN 0027-5514.

BLANCO-ULATE, B.; ROLSHAUSEN, P. E.; CANTU, D. Draft Genome Sequence of the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, 2013.

BOGUS, M. I. et al. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 9, p. 909-922, Sep 2007. ISSN 0022-1910.

BOLDO, J. T. et al. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Curr Genet**, v. 55, n. 5, p. 551-60, Oct 2009. ISSN 1432-0983.

BOLTANA, S. et al. Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 280, n. 1766, p. 11, Sep 2013. ISSN 0962-8452.

BOOMSMA, J. J. et al. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. In: BERENBAUM, M. R. (Ed.). **Annual Review of Entomology, Vol 59, 2014**. Palo Alto: Annual Reviews, v.59, 2014. p.467-485. (Annual Review of Entomology). ISBN 0066-4170978-0-8243-0159-0.

BREITLING, J.; AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 8, p. a013359, Aug 2013.

BROZA, M.; PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L. The nonsusceptibility of soil Collembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. **Pedobiologia**, v. 45, n. 6, p. 523-534, Dec 2001. ISSN 0031-4056.

BUIST, G. et al. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 838-847, May 2008. ISSN 0950-382X.

BUTT, T. M. et al. PATHOGENICITY OF THE ENTOMOGENOUS, HYPHOMYCETE FUNGUS, METARHIZIUM-ANISOPLIAE AGAINST THE CHRYSOMELID BEETLES PSYLLIODES-CHRYSOCEPHALA AND

PHAEDON-COCHLEARIAE. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 4, p. 327-334, 1992. ISSN 0958-3157.

CANTAREL, B. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, JAN 2009 2009. ISSN 0305-1048.

CHAUHAN, J. S.; RAO, A.; RAGHAVA, G. P. S. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 10, Jun 2013. ISSN 1932-6203.

CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 833-846, Jul 2013. ISSN 8756-7938.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, Sep-Oct 2012. ISSN 0734-9750.

CHOUVENC, T.; SU, N. Y.; ROBERT, A. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 3, p. 234-241, Jul 2009. ISSN 0022-2011.

_____. DIFFERENCES IN CELLULAR ENCAPSULATION OF SIX TERMITE (ISOPTERA) SPECIES AGAINST INFECTION BY THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE*. **Florida Entomologist**, v. 94, n. 3, p. 389-397, Sep 2011. ISSN 0015-4040.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol**, v. 4, n. 5, p. 197-203, May 1996. ISSN 0966-842X.

CORY, J. S.; FRANKLIN, M. T. Evolution and the microbial control of insects. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 5, p. 455-469, Jul 2012. ISSN 1752-4571.

CROUS, P. W. et al. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 19-22, 2004. ISSN 0166-0616.

CURRAN, J. et al. PHYLOGENY OF *METARHIZIUM* - ANALYSIS OF RIBOSOMAL DNA-SEQUENCE DATA. **Mycological Research**, v. 98, p. 547-552, May 1994. ISSN 0953-7562.

DA SILVA, M. V. et al. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 382-392, Apr 2005. ISSN 0923-2508.

DA SILVA, W. O. B. et al. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, n. 1, p. 10-15, Jan 2010. ISSN 1878-6146.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, Feb 2000. ISSN 0953-7562.

DUAN, Z. B. et al. A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 2351-2360, Sep 2009. ISSN 1462-2912.

DUBEY, M. et al. Disruption of the Eng18B ENGase Gene in the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* Affects Growth, Conidiation and Antagonistic Ability. **Plos One**, v. 7, n. 5, MAY 7 2012. ISSN 1932-6203.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345-60, Jun 2006. ISSN 0301-486X.

DUTRA, V. et al. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 245-251, MAY 2004. ISSN 0923-2508.

EBRAHIMI, L.; NIKNAM, G.; DUNPHY, G. B. Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 13, Jun 2011. ISSN 1536-2442.

ELLIOT, S. L. et al. Impacts of fever on locust life-history traits: costs or benefits? **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 181-184, Jun 2005. ISSN 1744-9561.

EMBRAPA. Pesquisadores formam linha de frente para controle da *Helicoverpa armigera*. 2013.

ERICKSON, P. R.; HERZBERG, M. C. THE STREPTOCOCCUS-SANGUIS PLATELET AGGREGATION-ASSOCIATED PROTEIN - IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE MINIMAL PLATELET-INTERACTIVE DOMAIN. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1646-1649, Jan 1993. ISSN 0021-9258.

EVANS, J. D.; SCHWARZ, R. S. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 614-620, Dec 2011. ISSN 0966-842X.

FAN, Y. H. et al. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 295-302, Jan 2007. ISSN 0099-2240.

_____. Increased virulence using engineered protease-chitin binding domain hybrid expressed in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 6, p. 376-380, Dec 2010. ISSN 0882-4010.

_____. Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 1, p. 93-99, Nov 2007. ISSN 1046-5928.

FANG, W. G. et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 363-370, Jan 2005. ISSN 0099-2240.

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

FLINT, M. L. et al. **Natural enemies handbook : the illustrated guide to biological pest control**. Oakland, Calif. Berkeley: UC Division of Agriculture and Natural Sciences ;University of California Press, 1998. viii, 154 p. ISBN 1879906414 (pbk.)1879906376 (hardbound).

FRANSEN, R. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 3, p. 247-262, DEC 2011 2011. ISSN 0167-7012.

FREEZE, H. H. Understanding Human Glycosylation Disorders: Biochemistry Leads the Charge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 10, p. 6936-6945, Mar 2013. ISSN 0021-9258.

GAO, Q. A. et al. Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **Plos Genetics**, v. 7, n. 1, p. 18, Jan 2011. ISSN 1553-7404.

GARRIDO, D. et al. Endo- β -N-acetylglucosaminidases from Infant Gut-associated Bifidobacteria Release Complex N-glycans from Human Milk Glycoproteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 775-785, 2012.

GERLACH, J. Q. et al. Differential release of high mannose structural isoforms by fungal and bacterial endo- β -N-acetylglucosaminidases. **Mol Biosyst**, v. 8, n. 5, p. 1472-81, Apr 2012. ISSN 1742-2051.

GINDIN, G. et al. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to Tick Eggs and the Effect of Egg Cuticular Lipids on Conidia Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 531-538, May 2009. ISSN 0022-2585.

_____. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1, p. 283-288, 2002. ISSN 0168-8162.

GODER, V. Roles of Ubiquitin in Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD). **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 5, p. 425-435, Aug 2012. ISSN 1389-2037.

GOLEBIOWSKI, M. et al. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 619-627, Jun 2008. ISSN 0965-1748.

GOON, S. et al. Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 659-671, Oct 2003. ISSN 0950-382X.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 4th Edition. Spring Harbor Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbour, 2012.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology-Sgm**, v. 158, p. 26-34, Jan 2012. ISSN 1350-0872.

GUNNARSSON, S. G. S. INFECTION OF SCHISTOCERCA-GREGARIA BY THE FUNGUS METARHIZIUM-ANISOPLIAE - CELLULAR REACTIONS IN THE INTEGUMENT STUDIED BY SCANNING ELECTRON AND LIGHT-MICROSCOPY. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n. 1, p. 9-17, Jul 1988. ISSN 0022-2011.

HAMAGUCHI, T. et al. Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Glycobiology**, v. 20, n. 4, p. 420-432, Apr 2010. ISSN 0959-6658.

HARRISON, M. J. et al. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 119-127, Aug 1998. ISSN 0014-2956.

HARVEY, D. J. et al. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. **Proteomics**, v. 9, n. 15, p. 3796-3801, Aug 2009. ISSN 1615-9853.

HEIDECHE, C. D.; PARSONS, T. B.; FAIRBANKS, A. J. Endohexosaminidase-catalysed glycosylation with oxazoline donors: effects of organic co-solvent and pH on reactions catalysed by Endo A and Endo M. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2433-2438, Dec 2009. ISSN 0008-6215.

HOJO, H. et al. Chemoenzymatic Synthesis of Hydrophobic Glycoprotein: Synthesis of Saposin C Carrying Complex-Type Carbohydrate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 21, p. 9437-9446, Nov 2012. ISSN 0022-3263.

HOWARD, M. et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627-635, NOV 2003 2003. ISSN 1367-5435.

HU, Q. B. et al. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 491-498, Oct 2006. ISSN 0041-0101.

HUANG, W. et al. MrpacC regulates sporulation, insect cuticle penetration and immune evasion in *Metarhizium robertsii*. **Environ Microbiol**, Mar 2014. ISSN 1462-2920.

HUANG, Y. et al. Combined expression of antimicrobial genes (Bbchit1 and LJAMP2) in transgenic poplar enhances resistance to fungal pathogens. **Tree Physiology**, v. 32, n. 10, p. 1313-1320, Oct 2012. ISSN 0829-318X.

IHRMARK, K. et al. Comparative Molecular Evolution of *Trichoderma* Chitinases in Response to Mycoparasitic Interactions. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 6, p. 1-25, 2010. ISSN 1176-9343.

INAGAKI, N. et al. Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: Mutational and biochemical analyses. **Gene**, v. 447, n. 2, p. 61-71, Nov 2009. ISSN 0378-1119.

INGLIS, G. D. et al. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. **Biological Control**, v. 8, n. 2, p. 143-152, Feb 1997. ISSN 1049-9644.

INGLIS, P. W. et al. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. **Fems Microbiology Letters**, v. 191, n. 2, p. 249-254, Oct 2000. ISSN 0378-1097.

JAEKEN, J. Chapter 179 - Congenital disorders of glycosylation. In: OLIVIER DULAC, M. L. A. H. B. S. (Ed.). **Handbook of Clinical Neurology**: Elsevier, v. Volume 113, 2013. p.1737-1743. ISBN 0072-9752.

JANG, M. K. et al. Physicochemical characterization of alpha-chitin, beta-chitin, and gamma-chitin separated from natural resources. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 3423-3432, Jul 2004. ISSN 0887-624X.

JEONG, J. Y. et al. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5440-5443, Aug 2012. ISSN 0099-2240.

JUNGES, A. ***Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína toxica de origem vegetal e análise genômica de quitinasas.** Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular: Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2010.

KARLSSON, M.; STENLID, J. Comparative evolutionary histories of the fungal chitinase gene family reveal non-random size expansions and contractions due to adaptive natural selection. **Evol Bioinform Online**, v. 4, p. 47-60, 2008. ISSN 1176-9343.

KEPLER, R. M.; REHNER, S. A. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 2, p. 210-217, Mar 2013. ISSN 1755-098X.

KIMELMAN, A. et al. A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. **Genome Res**, v. 22, n. 4, p. 802-9, Apr 2012. ISSN 1549-5469.

KIMURA, Y. et al. Double-Knockout of Putative Endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) Genes in *Arabidopsis thaliana*: Loss of ENGase Activity Induced Accumulation of High-Mannose Type Free N-Glycans Bearing N-Acetylchitobiosyl Unit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 1019-1021, 2011.

KIRKLAND, B. H.; CHO, E. M.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari : Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 414-421, Nov 2004. ISSN 1049-9644.

KLARSKOV, K. et al. Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein. **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 2, p. 143-154, Nov 1997. ISSN 0008-6215.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 2, p. 248-259, Feb 2012. ISSN 0022-2011.

LIN, L.; WANG, F.; WEI, D. Chlorimuron ethyl as a new selectable marker for disrupting genes in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. **J Microbiol Methods**, v. 87, n. 2, p. 241-3, Nov 2011. ISSN 1872-8359.

LIU, C. M.; HUANG, S. S.; TZENG, Y. M. Analysis of destruxins produced from *Metarhizium anisopliae* by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 3, p. 140-144, Mar 2004a. ISSN 0021-9665.

_____. Purification and quantitative analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 6, p. 1013-1025, 2004b. ISSN 1082-6076. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220591800005 >.

LIU, J.; CAO, Y. Q.; XIA, Y. X. Mmc, a gene involved in microcycle conidiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 2, p. 132-138, Oct 2010. ISSN 0022-2011.

LIU, X. et al. Natural enemies delay insect resistance to Bt crops. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90366, 2014. ISSN 1932-6203.

LIU, Z. Y. et al. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 3, p. 178-182, Oct 2001. ISSN 0022-2011.

LOMINO, J. V. et al. A two-step enzymatic glycosylation of polypeptides with complex N-glycans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 2262-2270, Apr 2013. ISSN 0968-0896.

LUBECK, I. et al. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, May-Aug 2008. ISSN 1754-5048.

MAMARABADI, M. et al. Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. **Fems Microbiology Letters**, v. 285, n. 1, p. 101-110, Aug 2008. ISSN 0378-1097.

MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W597-W600, Jul 2013. ISSN 0305-1048.

MEDZIHRADESKY, K. F. Characterization of protein N-glycosylation. In: BURLINGAME, A. L. (Ed.). **Mass Spectrometry: Modified Proteins and Glycoconjugates**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.405, 2005. p.116-138. (Methods in Enzymology). ISBN 0076-68790-12-182810-7.

MENT, D. et al. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 1570-1583, Jun 2012. ISSN 1462-2912.

_____. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 8, p. 956-967, Aug 2013. ISSN 0958-3157.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759-769, Sep 2011. ISSN 0171-9335.

MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448-462, Jul 2012. ISSN 1471-0072.

MURAKAMI, S. et al. Identification and characterization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. **Glycobiology**, v. 23, n. 6, p. 736-744, Jun 2013. ISSN 0959-6658.

NAKAZATO, L. et al. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the tef-1alpha homologous promoter. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 3, p. 521-8, Sep 2006. ISSN 0175-7598.

NAUMOFF, D. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. **Biochemistry-Moscow**, v. 76, n. 6, p. 622-635, JUN 2011 2011. ISSN 0006-2979.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS H.B. JR.; DEERFIELD, D. W. I. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **EMBNEW.NEWS**, n. 4:14, 1997.

NILSSON, I.; VON HEIJNE, G. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17338-17343, Jun 2000. ISSN 0021-9258.

NISHI, O. et al. Comparison of the germination rates of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 554-560, Dec 2013. ISSN 0266-8254.

NOTHAFT, H.; SZYMANSKI, C. Bacterial Protein N-Glycosylation: New Perspectives and Applications. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 10, p. 6912-6920, MAR 8 2013 2013. ISSN 0021-9258.

NYGREN, C. et al. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 3, p. 241-248, MAY 2007 2007. ISSN 0940-6360.

OUEDRAOGO, R. M. et al. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acidum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 2, p. 103-109, Feb 2003. ISSN 0022-2011.

PAL, S.; LEGER, R. J. S.; WU, L. P. Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, Mar 2007. ISSN 0021-9258.

PARRISH, J. R. et al. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p. 582-586, May-Jun 2004. ISSN 1535-3893.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUAREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 124-137, Jul-Aug 2007. ISSN 1532-0456.

PESHIN, R.; DHAWAN, A. K. **Integrated Pest Management: Innovation-Development Process Springer Publishing, New York: Springer, 2009.**

POCSI, I. et al. Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 514-523, Aug 2009. ISSN 1364-5072.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Vet Parasitol**, v. 201, n. 1-2, p. 128-36, Mar 2014. ISSN 1873-2550.

REN, X. X. et al. The chitinase gene (*Bbchit1*) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytospora chrysosperma* in *Populus tomentosa* Carr. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1317-1324, Sep 2010. ISSN 0141-5492.

RENZI, F. et al. The N-glycan Glycoprotein Deglycosylation Complex (Gpd) from *Capnocytophaga canimorsus* Deglycosylates Human IgG. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 6, p. 17, Jun 2011. ISSN 1553-7366.

ROBERTS, D. W. TOXINS FROM ENTOMOGENOUS FUNGUS METARRHIZIUM ANISOPLIAE - ISOLATION OF DESTRUXINS FROM SUBMERGED CULTURES. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 14, n. 1, p. 82-&, 1969. ISSN 0022-2011.

ROBERTS, G. et al. Distribution of endo-beta-N-acetylglucosaminidase amongst enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 620-626, Jul 2001. ISSN 0022-2615.

RONHOLM, J. et al. The *Listeria monocytogenes* serotype 4b autolysin IspC has N-acetylglucosaminidase activity. **Glycobiology**, v. 22, n. 10, p. 1311-1320, Oct 2012. ISSN 0959-6658.

ROWLEY, D. L.; POPHAM, H. J.; HARRISON, R. L. Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. **J Invertebr Pathol**, v. 107, n. 2, p. 112-26, Jun 2011. ISSN 1096-0805.

RUGGIANO, A.; FORESTI, O.; CARVALHO, P. ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 6, p. 868-878, Mar 2014. ISSN 0021-9525.

RUIZ-CANADA, C.; KELLEHER, D. J.; GILMORE, R. Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 272-283, Jan 2009. ISSN 0092-8674.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition. Cold Spring Harbour, New York: Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTI, L. et al. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874-880, Apr 2010. ISSN 0041-0101.

SAÏDA, F. et al. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. **Curr Protein Pept Sci**, v. 7, n. 1, p. 47-56, Feb 2006. ISSN 1389-2037.

SCHARDL, C. L. *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, n. 2, p. 69-82, Jul 2001. ISSN 1087-1845.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, Nov 2012. ISSN 1364-5072.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-74, Dec 2010. ISSN 1879-3150.

SEIDL, V. et al. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS J**, v. 272, n. 22, p. 5923-39, Nov 2005. ISSN 1742-464X.

SEIXAS, A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, n. 1-2, p. 149-56, Jul 2012. ISSN 1873-2534.

SEVIM, A. et al. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. **Current Genetics**, v. 58, n. 2, p. 79-92, Apr 2012. ISSN 0172-8083.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 5, p. 524-533, OCT 2009 2009. ISSN 0959-440X.

SHIN, K. S. et al. Differential Roles of the ChiB Chitinase in Autolysis and Cell Death of *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 5, p. 738-746, May 2009. ISSN 1535-9778.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, p. 6, Oct 2011. ISSN 1744-4292.

SJOGREN, J. et al. EndoS(2) is a unique and conserved enzyme of serotype M49 group A *Streptococcus* that hydrolyses N-linked glycans on IgG and alpha(1)-acid glycoprotein. **Biochemical Journal**, v. 455, p. 107-118, Oct 2013. ISSN 0264-6021.

SKROBEK, A.; BUTT, T. M. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Fems Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 23-28, Oct 2005. ISSN 0378-1097.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, Apr 2002. ISSN 0959-6658.

ST LEGER, R. et al. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 13, p. 6349-54, Jun 1996. ISSN 0027-8424.

ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 709-713, Feb 1998. ISSN 0099-2240.

STAATS, C. C. et al. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 76, n. 4, p. 945-50, Sep 2007. ISSN 0175-7598.

_____. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Biol**, v. 117, n. 2, p. 137-44, Feb 2013. ISSN 1878-6146.

STALS, I. et al. High Resolution Crystal Structure of the Endo-N-Acetyl-beta-D- Glucosaminidase Responsible for the Deglycosylation of *Hypocrea jecorina* Cellulases. **Plos One**, v. 7, n. 7, JUL 30 2012 2012. ISSN 1932-6203.

_____. Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. **Fems Microbiology Letters**, v. 303, n. 1, p. 9-17, FEB 2010 2010. ISSN 0378-1097.

_____. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the O- and N-glycosylation pattern of Cel7A. **Glycobiology**, v. 14, n. 8, p. 713-724, Aug 2004. ISSN 0959-6658.

STEVENSON, J. et al. A Practical Comparison of Ligation-Independent Cloning Techniques. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 7, Dec 2013. ISSN 1932-6203.

SUNG, G. H. et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, n. 57, p. 5-59, 2007. ISSN 0166-0616.

SUZUKI, T. et al. Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 9691-9696, Jul 2002. ISSN 0027-8424.

TADASHI, T.; MASUDA, T.; KOYAMA, Y. Enhanced gene targeting frequency in ku70 and ku80 disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n. 5, p. 460-470, May 2006. ISSN 1617-4615.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, Dec 2013. ISSN 0737-4038.

TAY, W. T. et al. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013. ISSN 1932-6203.

TRAGUST, S. et al. Ants Disinfect Fungus-Exposed Brood by Oral Uptake and Spread of Their Poison. **Current Biology**, v. 23, n. 1, p. 76-82, Jan 2013. ISSN 0960-9822.

TULLOCH, M. GENUS METARHIZIUM. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. JUN, p. 407-411, 1976. ISSN 0007-1536.

TZELEPIS, G. et al. Endo- β -N-acetylglucosamidases (ENGases) in the fungus *Trichoderma atroviride*: Possible involvement of the filamentous fungi-specific cytosolic ENGase in the ERAD process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, n. 2, p. 256-261, 6/27/ 2014. ISSN 0006-291X.

TZELEPIS, G. D. et al. Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol**, v. 49, n. 9, p. 717-30, Sep 2012. ISSN 1096-0937.

_____. Functional analysis of the C-II subgroup killer toxin-like chitinases in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 64, p. 58-66, Mar 2014. ISSN 1087-1845.

UBHAYASEKERA, W.; KARLSSON, M. Bacterial and fungal chitinase chiJ orthologs evolve under different selective constraints following horizontal gene transfer. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012/10/24 2012.

UMEKAWA, M. et al. Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 8, p. 4469-4479, Feb 2008. ISSN 0021-9258.

VAN AALTEN, D. M. F. et al. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5842-5847, 2000.

VANDERBIJ, A. J. et al. Plasmid stability in *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1076-1080, Mar 1996. ISSN 0099-2240.

VARKI, A. et al. Symbol nomenclature for glycan representation. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5398-5399, Dec 2009. ISSN 1615-9853.

VERCHOT, J. The ER quality control and ER associated degradation machineries are vital for viral pathogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 11, Mar 2014. ISSN 1664-462X.

VILCINSKAS, A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 206-214, May-Jun 2010. ISSN 2150-5594.

_____. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 2, p. 123-129, Feb 2013. ISSN 0022-1910.

VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Thichoderma asperellum* (T-harzianum T-203). **Current Genetics**, v. 42, n. 2, p. 114-122, Nov 2002. ISSN 0172-8083.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 937-947, 2005.

WANG, C. S.; SKROBEK, A.; BUTT, T. M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 3, p. 168-174, Mar 2004. ISSN 0022-2011.

WANG, C. S.; ST LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 5, p. 808-816, May 2007. ISSN 1535-9778.

WANG, C. S.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Fems Microbiology Letters**, v. 213, n. 2, p. 251-255, Aug 2002. ISSN 0378-1097.

WANG, T. W. et al. Available methods for assembling expression cassettes for synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1853-1863, Mar 2012. ISSN 0175-7598.

XIAO, G. H. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, p. 10, Jul 2012. ISSN 2045-2322.

YAN, A. X.; LENNARZ, W. J. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3121-3124, Feb 2005. ISSN 0021-9258.

YANAGAWA, A.; YOKOHARI, F.; SHIMIZU, S. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 2, p. 165-170, Feb 2008. ISSN 0022-2011.

YIN, J. et al. Structural Basis and Catalytic Mechanism for the Dual Functional Endo-beta-N-Acetylglucosaminidase A. **Plos One**, v. 4, n. 3, p. 11, Mar 2009. ISSN 1932-6203.

YU, J. H. et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 11, p. 973-981, Nov 2004. ISSN 1087-1845.

YU, X. H. et al. EndoS Reduces the Pathogenicity of Anti-mCOL7 IgG through Reduced Binding of Immune Complexes to Neutrophils. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 6, Feb 2014. ISSN 1932-6203.

ZHANG, C. B.; XIA, Y. X. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. **Current Genetics**, v. 55, n. 4, p. 399-407, Aug 2009. ISSN 0172-8083.

ZHAO, H. et al. Host-to-Pathogen Gene Transfer Facilitated Infection of Insects by a Pathogenic Fungus. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 4, p. e1004009, 2014.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007/10/01 2007. ISSN 0958-3157.