



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RUBENS TADEU DELGADO DUARTE

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*
(CG423) VIA *Agrobacterium tumefaciens***

LONDRINA
2005

RUBENS TADEU DELGADO DUARTE

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*
(CG423) VIA *Agrobacterium tumefaciens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dr.^a Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2005

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Fungos situado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os recursos financeiros deste projeto são provenientes do CNPq, CAPES, Fundação Araucária e PROPPG/UEL.

DEDICO:

*Aos meus pais **Rubens** e **Inês**,
que sempre investiram em minha formação...
com carinho, amor, e paciência.*

*A **Márcia C. Furlaneto**,
pelo carinho, paciência, dedicação e
apoio durante todo o nosso convívio.*

AGRADECIMENTOS

Os momentos vividos no laboratório constituíram, antes de tudo, o maior e mais importante experimento que já realizei. A formação acadêmica, desde os tempos de graduação, estimulou o meu fascínio pelo exercício de se perder e se encontrar nos labirintos de um pensamento complexo. Neste sentido, os momentos que transporem no laboratório desvendaram-me becos, ruelas e esquinas nos quais vislumbrei aquilo que unicamente o conhecer efetivo pode proporcionar, ou seja, não o debruçar-se sobre o que convém conhecer, legitimando o saber que já possuímos, mas separar-se de si nos descaminhos em que nos perdemos de nós mesmos e ousamos pensar diferente do que comumente pensamos. No entanto, possuir esse tipo de curiosidade e embebedar-se com a alegria dela, são experiências para as quais eu jamais despertaria se certos flancos não tivessem sido abertos. Explicita-se, assim, a imensa relevância dos resultados obtidos em tal experimento. Portanto, faço questão de declarar meus agradecimentos:

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade e pela formação recebida.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, amiga e orientadora deste trabalho, por todo o apoio, a dedicação, incentivo e pelos valiosos conhecimentos transmitidos em todos esses anos.

Aos pesquisadores Dr. André L. Laforga Vanzela, Dr. Celso V. Nakamura, Dr. Laurival A. Vilas Boas, Dra. Maria Angélica E. Watanabe, Dra. Maria Helena P. Fúngaro e Dr. Sérgio Suzart pela gratificante amizade, pela disponibilidade dos equipamentos de seus laboratórios e pelas sugestões relevantes à conclusão dos experimentos.

Aos professores Dr. Augusto Schrank, Dra. Maria Helena P. Fúngaro, Dr. Sérgio Suzart, Dra. Shiduca I. Jankevicius e Dra. Sueli F. Y. Ogatta, pela amizade, incentivo e pelas fundamentais colaborações críticas como membros das bancas examinadoras de plano, qualificação e defesa de dissertação

Aos eternos amigos de laboratório: Angelo Laranjeira, Ariane Costa, Ariane Donatti, Bruno Dias, Camila Baroni, Cláudia de Paula, Daiane Lopes, Daniel Silva, Ivan Lima, Marcelo Oliveira, Maria Cecília dos Reis e Rafaele Moleiro, pela agradável convivência, pelos difíceis momentos compartilhados, por todo o auxílio nos experimentos, pelas sugestões críticas dos resultados e pelas “discussões filosóficas no corredor”.

Aos que estiveram no laboratório, mesmo que por pouco tempo: Ana Rita, Charley e Mariana, pela amizade e colaborações nos experimentos.

Aos amigos-vizinhos de laboratório: Andréa, Carlos Eduardo, Carolina, Daniele, Helen, Jaqueline, Juliana, Karen, Lígia, Luis Rodrigo, Márcia, Marla, Renan, Sandra e Thiago, por todo o companheirismo e apoio.

Aos companheiros do curso de pós-graduação: Bruno, Cíntia, Custódio, Eduardo, Fabiani, Janaína, Maria, Marie, Milena, Pâmela, Patrícia, Rafaela, e Rita, pelo convívio e amizade durante todos os obstáculos de nossa formação acadêmica.

Aos professores do curso de pós-graduação, pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial, à Claci e Rosilda, cujos esforços possibilitaram que este trabalho fosse realizado da forma mais fácil possível.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas da UEL, principalmente ao Sr. Carraro, Sr. Cláudio, Sr. Francisco e Sr. Viana, por facilitarem meu trabalho através do uso de suas atribuições.

À Thatiza Curuci, pelos dias vividos, pelos dias sonhados e, principalmente, por tudo que me representa.

Aos meus amigos e familiares, pelo incentivo, compreensão, paciência e incentivo recebido ao longo desses anos.

À CAPES pela bolsa cedida, ao CNPq e Fundação Araucária por financiar o projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

“Não podemos esquecer que quando o [elemento] rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais [no tratamento de câncer]. Era um trabalho de ciência pura, e isso é prova de que um trabalho científico não deve ser avaliado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele precisa ser feito por si só, pela **beleza da ciência.**”

Marie Curie (1867-1934), descobridora da radioatividade, duas vezes ganhadora do Prêmio Nobel

“Escolha um trabalho que você ame e não terá de trabalhar um único dia em sua vida.”

Sigmund Freud (1856-1939)

“(…) An incubation time of 15-30 minutes at room temperature has generally been found sufficient for DNA uptake. Various versions of the basic protocols are used according to laboratory preferences and **superstitions.**”

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 189-195, 2002.

"A galinha é apenas um meio de um ovo chegar a outro ovo."

Rubens Duarte

RESUMO

Neste trabalho foi descrita a transformação genética da linhagem CG423 de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (AGL-1), sendo também estudada a interação destas células durante o co-cultivo. Nos experimentos de transformação foram empregados dois vetores binários distintos, ambos contendo o gene de resistência ao benomil (β -tubulina) como marcador de seleção. A eficiência de transformação foi de até 53 transformantes por 10^5 conídios alvos. Alta estabilidade mitótica dos transformantes (89-97%) foi demonstrada após cinco transferências sucessivas em meio não-seletivo. Transformantes altamente resistentes foram obtidos, os quais apresentaram capacidade de desenvolvimento em concentrações de até $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de benomil. Neste trabalho foram obtidos três possíveis mutantes insercionais com alteração na produção de proteases. Esta metodologia poderá representar uma ferramenta útil visando estudos de mutagênese insercional em *M. anisopliae* var. *acridum*.

Palavras-chaves: Aderência, Transformação mediada por *Agrobacterium*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, resistência ao benomil, mutantes protease

ABSTRACT

We report that *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 attaches to and genetically transforms the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423. The *Agrobacterium*-mediated transformation was applied using two distinct binary vectors carrying a benomyl resistance (β -tubulin) gene as a selection marker. The efficiency of transformation was up to 53 transformants per 10^5 target conidia. High mitotic stability of the transformants (89-97%) was demonstrated after five successive transfers on non-selective media. Highly resistant transformants were obtained which showed capacity of growing on increased concentrations of benomyl (up to $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). We obtained three putative T-DNA-tagged mutants with altered protease production. Thus, the described protocol could provide a useful tool to tag genes that may be important for pathogenesis and virulence of this fungus.

Keywords: *Agrobacterium* attachment, *Agrobacterium*-mediated transformation, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, benomyl resistance, protease mutants

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Fungos entomopatogênicos comercializados ou em processo de comercialização utilizados para o controle biológico (adaptado de BUTT et al.,2001).....	20
TABELA 2: Principais pragas agrícolas e urbanas do Brasil suscetíveis a <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
TABELA 3: Grupos de subtilisinas de <i>M. anisopliae</i> (adaptado de BAGGA et.al., 2004).	33
TABELA 4: Resumo dos processos celulares envolvidos na interação. <i>Agrobacterium</i> -planta (adaptado de SHENG & CITOVSKY, 1996)	52
TABELA 5: Vetores binários utilizados no sistema de transformação mediado por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (adaptado de KLEE, 2000)	54
TABELA 6: Espécies de fungos filamentosos transformadas via <i>A.tumefaciens</i>	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do fungicida benomil 38

Figura 2: Sequências flanqueadoras do T-DNA 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE GAFANHOTOS-PRAGAS	16
2.2 O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	22
2.2.1 Processo de infecção e fatores de virulência	25
2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS	34
2.3.1 Marcadores de seleção	36
2.3.2 Metodologias de transformação genética.....	38
2.4 O SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	43
2.4.1 Mecanismo de transferência do T-DNA.....	46
2.4.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> como ferramenta de transformação Genética.....	52
2.4.3 Transformação genética de fungos via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
2.4.3.1 Variáveis do sistema <i>Agrobacterium</i> na transformação de fungos.....	59
2.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	62
REFERÊNCIAS	65
Artigo: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation and protease mutants isolation in the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	84
3 CONCLUSÕES	104

ANEXOS	105
Anexo I - Transformação da linhagem AGL-1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . com os vetores binários pBINT6 e pCAB3100.....	106
Anexo II - Ensaio de adesão entre <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e conídios de . <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (CG423)	107
Anexo III - Protocolo de transformação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . (CG423) via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	110
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

Os gafanhotos compreendem uma das maiores pragas da agricultura desde a antiguidade. No Brasil, a partir da década de 80, os gafanhotos-pragas têm gerado perdas consideráveis em culturas como cana-de-açúcar, milho, arroz e pastagens. Entre as espécies de gafanhotos mais prejudiciais destaca-se *Rhammatocerus schistocercoides* nas regiões Nordeste e Centro Oeste. O controle desta praga vem sendo realizado com inseticidas químicos que, por sua própria natureza, geram problemas de segunda instância à população. O emprego de biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos tem sido considerado uma alternativa atrativa no controle de *R. schistocercoides*.

Em um programa de isolamento e caracterização de fungos entomopatogênicos visando o controle deste gafanhoto, foram avaliadas diversas linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, na qual se destacou a linhagem CG423. Tanto em bioensaio quanto nos testes em campo, esta linhagem apresentou alta virulência (>85%), tornando-se um candidato promissor para uso no controle biológico de gafanhotos-pragas. Os fatores de virulência mais caracterizados de *M. anisopliae* var. *acridum* compreendem proteases degradadoras de cutícula, dentre estas as proteases com atividade tipo-subtilisina (Pr1) e atividade tipo-tripsina (Pr2).

O desenvolvimento de técnicas da engenharia genética e a aplicação destas na investigação de fenômenos biológicos tem propiciado um maior conhecimento sobre a biologia molecular de fungos entomopatogênicos. A elaboração de sistemas de transformação genética para estes fungos surge como uma ferramenta adicional nos estudos de virulência, permitindo a identificação de genes clonados e a

determinação de suas funções. Além disso, permite a construção de linhagens com aumento de sua capacidade bioinseticida.

Recentemente, foi descrita a transformação de fungos filamentosos mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (agro-transformação). O sistema *Agrobacterium* envolve a capacidade natural desta bactéria em transferir parte de seu plasmídeo (T-DNA) para células hospedeiras. Esta metodologia tem permitido a obtenção de um maior número de transformantes para vários fungos, quando comparado às metodologias de transformação tradicionais. Além disso, na agro-transformação é comum a ocorrência de integração aleatória do T-DNA em sítios únicos do genoma da célula hospedeira, o que tem estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta na obtenção de mutantes (mutagênese insercional), facilitando a posterior caracterização de genes relacionados a fatores de virulência.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos propostos para este trabalho foram:

- Estabelecer a metodologia de transformação para *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG423) utilizando o sistema *Agrobacterium tumefaciens*;
- Gerar um banco de transformantes para posterior análise de mutagênese insercional;
- Selecionar possíveis mutantes insercionais para síntese de enzimas proteolíticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE GAFANHOTOS-PRAGAS

Estima-se que a Ordem Insecta possua cerca de 2,5 milhões de espécies e seja o grupo mais diversificado além dos microrganismos, correspondendo a quase 67% das espécies descritas entre plantas e animais (SHAH & PELL, 2003). Cerca de 10% dos insetos podem ser considerados pragas agrícolas ou pragas urbanas por competirem com a espécie humana por alimento e espaço (ALVES, 1998).

Os primeiros relatos de insetos-pragas vem desde a antiguidade, quando os chineses (2700 a.C.) e egípcios (2200 a.C.) registraram doenças causadas por Lepidopteras e Hymenopteras, respectivamente. Entretanto, o desenvolvimento de estratégias de controle de insetos-pragas foi mencionado somente no século XVII, quando os ingleses utilizaram um macerado de lagartas (provavelmente contendo vírus) para controlar uma praga de floresta (ALVES, 1998).

De todos os insetos-pragas, os gafanhotos (Orthoptera: Acrididae) talvez sejam os mais conspícuos. Eles possuem uma alta taxa reprodutiva e são capazes de responder rapidamente a condições climáticas favoráveis. Muitas espécies, quando há um aumento na densidade populacional, desenvolvem um comportamento agregativo e migratório, levando a formação de grandes enxames (LOMER et al., 2001). Estes insetos são capazes de consumir o equivalente a seu próprio peso por dia, e uma nuvem de gafanhotos-pragas (40 milhões de indivíduos por quilômetro quadrado) pode chegar a consumir cerca de 80 mil toneladas de produtos agrícolas. Sua dieta tem

como base monocotiledôneas economicamente importantes como a cana-de-açúcar, arroz, milho e pastagens (COSENZA et al., 1994).

Enxames de gafanhotos-pragas são descritos desde as épocas bíblicas (Êxodo 10:12-15), tratando-se provavelmente do “gafanhoto do deserto”, *Schistocerca gregaria* (COSENZA et al., 1989). Atualmente esta praga é encontrada em todos os continentes, sobretudo na África do Sul, Austrália, Argentina, Brasil, China, Estados Unidos, Niger, Rússia e países do Oriente Médio (SHOWLER, 1996; LOMER et al., 2001).

No Brasil existem 23 espécies de gafanhotos-pragas descritas, das quais três merecem destaque pelos prejuízos econômicos causados: *Schistocerca pallens* (Nordeste e Distrito Federal), *Stiphra robusta* (Nordeste) e *Rhammatocerus schistocercoides* (Centro-Oeste). Destas três, *R. schistocercoides* parece ter uma distribuição geográfica bem mais ampla, estando presente em algumas regiões da América do Sul e Central (EMBRAPA, 1997). As estimativas dos prejuízos gerados por estas espécies são pouco precisas, mas calcula-se que *R. schistocercoides* causou perdas de 84 milhões de litros de álcool, 600.000 toneladas de soja, 75.000 toneladas de arroz e 22.500 toneladas de milho no início dos anos 80 (CURTI & BRITTO, 1987).

Desde 1950, diversos produtos químicos vêm sendo utilizados em larga escala na tentativa de controle desta praga, em que se destacam o fenitrothion e malathion. O uso indiscriminado destes organofosforados tem revelado grandes problemas ambientais como o desequilíbrio ecológico, a seleção de insetos resistentes e a contaminação do solo e de lençóis freáticos. Muito embora a população de gafanhotos seja suscetível a estes inseticidas, o aparecimento de novos enxames é

imprevisível, tornando as medidas de controle preventivo uma estratégia atraente sob as perspectivas econômica e ambiental (LOMER et al., 2001).

O uso de práticas naturais no controle de insetos-pragas, assim como medidas culturais para promovê-la, consistem a base do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Esta estratégia tem como objetivo manter a população de insetos-pragas em níveis que não afetem o rendimento econômico. Entre as diversas estratégias utilizadas no MIP, o controle biológico a base de fungos entomopatogênicos torna-se um campo promissor pelas próprias características de diversidade e especificidade destes microrganismos, além do baixo custo na produção em larga escala (ALVES, 1998).

Os fungos apresentam vantagens em relação a outros microrganismos entomopatogênicos como grande distribuição geográfica, alta variabilidade genética, capacidade de disseminação horizontal e capacidade de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (McCOY & MILANI-TIGANO, 1996). Além disto, na maioria das doenças causadas por fungos entomopatogênicos a penetração ocorre via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto através do mesêntero (ALVES, 1998).

Entretanto, o uso de microrganismos no controle de insetos-praga apresenta algumas desvantagens como a necessidade de cuidados especiais no armazenamento, o desenvolvimento de técnicas de formulações viáveis e condições ambientais favoráveis para a patogenia como temperatura, umidade e luminosidade (MESSIAS, 1989; ALVES, 1998). Em determinados casos, o controle biológico pode ser tardio enquanto o controle químico apresenta efeito imediato. Neste sentido, o tempo entre a aplicação do produto e a morte do inseto é um dos principais entraves

para a utilização de bioinseticidas. Estratégias que permitam diminuir o tempo de a morte da praga são alvos de muitas pesquisas na área do controle biológico por fungos entomopatogênicos.

Em termos quantitativos, calcula-se que aproximadamente 80% das doenças de insetos têm os fungos como agentes etiológicos, abrangendo 90 gêneros e 700 espécies. A maioria destes gêneros ocorre no Brasil, sendo mais de 20 os relacionados a pragas da agricultura (ALVES, 1998). Entre os gêneros mais estudados destacam-se *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Entomophthora* (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Muitos países já comercializam produtos de controle biológico a base desses gêneros, o que reflete o grande interesse na exploração dos fungos como controlador de insetos-pragas (Tabela 1).

Tabela 1. Fungos entomopatogênicos comercializados ou em processo de comercialização utilizados para o controle biológico (adaptado de BUTT et al., 2001).

Produto	Fungo	Inseto-alvo	Produtor
Biogreen	<i>Metarhizium anisoplae</i>	Larva de escaravelho em pastagens	Biocare Technology, Austrália
Metaquino	<i>M. anisoplae</i>	Cigarrinhas	Brasil
Bio-Path	<i>M. anisoplae</i>	Gafanhotos	EcoScience, EUA
Bio-Blast	<i>M. anisoplae</i>	Cupins	EcoScience, EUA
Cobican	<i>M. anisoplae</i>	Cigarrinha da cana-de-açúcar	Probiagro, Venezuela
Green Muscle	<i>Metarhizium anisoplae</i> var. <i>acridum</i>	Gafanhotos	CABI Bioscience, Inglaterra
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>	Broca-do-café	Live Systems Technology, Colômbia
Ostrinil	<i>B. bassiana</i>	Broca-do-milho	Natural Plant Protection, França
CornGuard	<i>B. bassiana</i>	Broca-do-milho europeu	Mycotech, EUA
Mycotrol GH	<i>B. bassiana</i>	Gafanhotos	Mycotech, EUA
Mycotrol Wp & BotaniGard	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca, afídeos	Mycotech, EUA
Naturalis-L	<i>B. bassiana</i>	Pragas do algodoeiro	Troy Biosciences, EUA
Proecol	<i>B. bassiana</i>	Lagarta	Probiagro, Venezuela
Boverin	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga URSS
Boverol e Boverosil	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga Tchecoslováquia
Engerlingspilz	<i>B. bassiana</i>	Besouros	Andermatt, Suíça
Schweizer	<i>Beauveria brongniartii</i>	Besouros	Eric Schweizer, Suíça
Melocont	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Kwizda, Áustria
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosca branca	ECO-tek, EUA
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Mosca branca	Agrobionsa, México
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>	Mosca branca	Koppert, Holanda
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	Afídeos	Koppert, Holanda
Laginex	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquito	AgraQuest, EUA

Embora não se destaque na comercialização de bioinseticidas, o Brasil tem tradição na área de entomopatógenos, pois desde a década de 70 comercializa *M. anisopliae* como agente controlador das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) e de pastagens (gêneros *Deois* e *Zulia*), além de *B. bassiana* como controlador do moleque-da-bananeira (PARRA, 2004).

No contexto do controle biológico de gafanhotos-pragas, as espécies *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* vêm sendo estudadas por apresentarem alta virulência, resistência a diferentes temperaturas, relativa especificidade de hospedeiros e por ser de fácil produção laboratorial (GOETTEL et al., 1995; LOMER et al., 2001).

Em 1986 o governo brasileiro deu início a um programa nacional de combate ao “gafanhoto do Mato Grosso” (*R. schistocercoides*) visando esclarecer seu ciclo biológico e ecologia, além de propor novas estratégias de controle desta praga (BARRIENTOS, 1995). Vale ressaltar, dada a importância desta praga, que a EMBRAPA utilizou recursos de monitoramento via satélite para caracterizar o biótopo natural dos gafanhotos brasileiros, o que representou o emprego de uma ferramenta inédita para abordagem de um problema entomológico de tal importância econômica (EMBRAPA, 1996).

Não obstante, o projeto brasileiro deu grande ênfase na busca e caracterização de inimigos naturais dos gafanhotos, onde se destacou o isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* (= *M. flavoviride*). O isolado foi encontrado em cadáveres de *S. pallens* (MOREIRA et al., 1996) e demonstrou ser altamente virulento para *R. schistocercoides* (85% mortalidade) e *S. pallens* (86%) (MAGALHÃES et al., 1997; XAVIER-SANTOS et al., 1999).

2.2 O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um ascomiceto da Classe Sordariomicete, Ordem Hipocreales e Família Clavicipitaceae (LIU et al., 2001). Foi identificado pela primeira vez na Rússia em 1879, quando o zoologista Ilya Metchnikoff o isolou de larvas de um curculionídeo *Anisopliae austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae), importante praga da beterraba. Metchnikoff classificou-o como *Entomophthora anisopliae* e mais tarde, por volta de 1883, foi reclassificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (ALVES, 1998). Baseando-se em características bioquímicas e morfológicas, como o tamanho e forma de conídios, Tulloch (1976) classificou o gênero nas espécies *M. anisopliae* (var. *anisopliae* e *major*) e *M. flavoviride*. Mais recentemente, Driver e colaboradores (2000) propuseram uma nova classificação para o gênero através de análises moleculares de sequências ITS (“Internal Transcribed Spacers”), DNA ribossomal (5,8S e 28S) e RAPD-PCR (“Random Amplification of Polymorphic DNA – PCR”). De acordo com estes autores, sua classificação compreende as espécies *Metarhizium anisopliae* (var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *lepidiotum* e var. *acridum*), *Metarhizium flavoviride* (var. *flavoviride*, var. *minus*, var. *novazealandicum* e var. *pemphingum*) e *Metarhizium album*.

A morfologia do gênero *Metarhizium* é caracterizada por um micélio hialino e septado. Os conídios variam de cilíndricos a ovóides, com dimensões variando de 3 a 18 μm (var. *anisopliae*) ou 4 a 7-11 μm (var. *acridum* e var. *flavoviride*). A cor dos conídios varia do verde-oliva ao verde-amarelado e geralmente são uninucleados (TINLINE & NOVIELLO, 1971), com pequena proporção de binucleados (LUNA & AZEVEDO, 1985). A variação na forma e tamanho dos conídios parece ser uma

característica do gênero, não se relacionando às condições de cultura (LUNA & AZEVEDO, 1985). Em condições laboratoriais, o crescimento ótimo ocorre em pH 6,9 e temperaturas entre 24 e 30°C (ALVES, 1998). Na presença de alta umidade e substrato adequado, os conídios iniciam a germinação em ~16-20 horas (LOMER et al., 2001). A reprodução pode ser assexual, caracterizada pelo crescimento vegetativo, e parassexual, onde ocorrem os processos de recombinação mitótica e heterocariose (MESSIAS & AZEVEDO, 1980). Análises através da eletroforese de campo alternado (PFGE – “Pulsed Field Gel Electrophoresis”) revelaram variações no número de cromossomos, sendo encontrado de 7 a 8 cromossomos na maioria dos isolados. O tamanho do genoma foi estimado entre 23,39 e 31,88 Mb (VALADARES-INGLIS & PEBERDY, 1998) e a presença de micovírus (RNA fita dupla) na forma livre-citoplasmática ocorre em vários isolados (MARTINS et al., 1999). São conhecidos teleomorfos, tais como *Cordyceps taii* (= *Metarhizium taii*) e *Cordyceps brittlebankisoides* (= *Metarhizium anisopliae* var. *majus*) (LIU et al., 2001).

O gênero *Metarhizium* é capaz de infectar mais de 300 espécies de insetos, incluindo 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Homoptera. O controle destes insetos-pragas por *Metarhizium* vem sendo analisado em vários países (FARGUES et al., 1975; ALVES, 1998).

A espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* tem sido a melhor estudada, sendo considerada um modelo dentro do gênero. Isolados desta espécie tem sido testados com sucesso em ensaios de campo em vários países da América, Europa, Ásia, África e Oceania (LOMER et al., 2001). No Brasil, esta espécie é utilizada no controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (Nordeste) e tem potencial para o controle de

pragas do arroz, soja e alface (LOPES et al., 2000). Além de pragas da agricultura, *M. anisopliae* var. *anisopliae* também apresenta alta virulência contra

pragas urbanas como o vetor da doença de Chagas, *Triatoma infestans* (LUZ et al., 1998). Outros hospedeiros do gênero *Metarhizium*, com relevante importância para a economia e saúde, estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Principais pragas agrícolas e urbanas do Brasil suscetíveis a *Metarhizium anisopliae*.

Cultura ou doença	Praga agrícola / urbana	Referências
Monocotiledôneas (arroz, milho, cana-de-açúcar e pastagens)	Gafanhotos-praga (<i>Rhammatocerus schistocercoides</i> , <i>Schistocerca pallens</i> e <i>Stiphra robusta</i>)	ALVES, 1998; MAGALHÃES et al., 2001
Soja	Percevejo-da-soja (gêneros <i>Nezara</i> e <i>Piezodorus</i>)	SOSA-GOMEZ & MOSCARDI, 1998
Culturas variadas	Formigas (<i>Atta sexdens</i>)	LOUREIRO & MONTEIRO, 2004
Algodão	Curuquerê-do-algodoeiro (<i>Alabama argillacea</i>)	FILHO et al., 2002
Café	Broca-do-café (<i>Hypothenemus hampei</i>)	SAMUELS et al., 2002
Cana-de-açúcar	Broca da cana-de-açúcar (<i>Diatraea saccharalis</i>)	DESTÉFANO et al., 2004
Cana-de-açúcar	Cigarrinha da cana-de-açúcar (<i>Mahanarva posticata</i>)	MARQUES & VILAS-BOAS, 1978
Pastagens	Cigarrinha-da-pastagem (gêneros <i>Deois</i> e <i>Zulia</i>)	ONOFRE et al., 2002
Carrapato	<i>Boophilus microplus</i>	CORREIA et al., 1998
Doença de Chagas	Triatomídeos (<i>Triatoma infestans</i>)	LUZ et al., 1998
Dengue e Febre amarela	<i>Aedes aegypti</i>	SANDHU et al., 1993
Malária	<i>Anopheles gambiae</i>	SCHOLTE et al., 2003
Várias doenças infecciosas	Baratas (<i>Periplaneta americana</i> e <i>Blattella germanica</i>)	QUESADA-MORAGA et al., 2004

Os hospedeiros da espécie *M. anisopliae* var. *acridum* são restritos a gafanhotos-pragas do grupo dos acridídeos (Orthoptera: Acridoidea), como por exemplo

R. schistocercoides, *S. pallens*, *S. gregaria* e *S. robusta* (LOMER et al., 2001). A análise da dosagem e tempo de mortalidade para várias espécies de gafanhotos demonstrou que isolados de *M. anisopliae* var. *acidum* são mais virulentos a estes insetos quando comparados a *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *B. bassiana* (NOWIERSKI et al., 1996).

Já existem produtos comerciais à base de *M. anisopliae* var. *acidum* (Tabela 1) e vários programas de pesquisa relacionados a aspectos básicos e aplicados estão sendo desenvolvidos com isolados desta espécie.

O produto comercial “Green Muscle”, à base de conídios de *M. anisopliae* var. *acidum*, vem sendo aplicado com êxito no controle de *S. gregaria* na África (SHAH et al., 2003). A eficiência desta espécie foi comparada à ação de inseticidas no controle de gafanhotos africanos e, a exceção do tempo necessário para a morte da praga, *M. anisopliae* var. *acidum* superou o inseticida padrão (fenitrothion) em todos os aspectos analisados (LANGEWALD et al., 1999). Ainda nos ensaios em campo africano, foi comparado o efeito de *M. anisopliae* var. *acidum* e de fenitrothion sobre insetos não-alvos. Os resultados obtidos demonstraram que *M. anisopliae* var. *acidum* pôde ser tão efetivo quanto o organofosfato sem ameaçar insetos que não os ortópteros (PEVELING et al., 1999).

2.2.1 Processo de infecção e fatores de virulência

O desenvolvimento da patogenia nos insetos é caracterizado por etapas bem definidas, sendo elas: adesão à cutícula do hospedeiro, germinação do conídio, formação do apressório e grampo de penetração, penetração através da cutícula por

ação mecânico-enzimática, colonização do corpo do inseto, produção de toxinas, exteriorização, conidiogênese e disseminação (ST. LEGER et al., 1991b; ALVES, 1998; CLARKSON et al., 1998). A adesão do conídio é dependente da hidrofobicidade da superfície. A camada superficial da cutícula dos insetos é denominada epicutícula e tem natureza hidrofóbica, constituindo-se de proteínas com um revestimento lipídico (ácidos graxos e esteróis). A camada subsequente, denominada procutícula, tem composição protéica (61%), quitinosa (30%) e lipídica (7%), sendo responsável pela maior parte da cutícula (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BIDOCHKA et al., 1997). O processo de adesão depende ainda da presença de enzimas (esterases e proteases) presentes na superfície dos conídios, favorecendo a sua nutrição e germinação (ST. LEGER et al., 1991b).

Na extremidade do tubo germinativo, para a maioria dos fungos, ocorre uma dilatação da hifa denominada de apressório. Esta estrutura inicia o processo de penetração através da cutícula. O evento da penetração parece ser dependente de elementos físicos (pressão mecânica da hifa sobre áreas membranosas) e químicos (ação enzimática de proteases, *N*-acetilglicosaminidases, lipases e quitinases) (ST LEGER et al., 1988b).

O processo químico depende da ação primária destas enzimas na hidrólise dos componentes cuticulares, permitindo a posterior atividade de enzimas quitinolíticas (BIDOCHKA et al., 1997). Em seguida, ocorre a colonização da hifa na cavidade interna do hospedeiro, e posteriormente a diferenciação destas em blastósporos na hemocele. Esta, por constituir um ambiente rico em nutrientes, permite a produção de metabólitos secundários (dextruxinas e citocalasinas) que levam à paralisia muscular e inibição da atividade de hemócitos do hospedeiro (KERSHAW et

al., 1999). Estas toxinas, juntamente ao estrangulamento dos órgãos internos causado pela presença das hifas, parecem ser os responsáveis pela morte do hospedeiro em poucos dias. O patógeno inicia então, um processo de exteriorização à cutícula do cadáver com subsequente produção de estruturas reprodutivas. Os conídios exteriorizados podem ser dispersos pelo vento, chuva e animais, dando início a um novo ciclo de infecção (ALVES, 1998; CLARKSON et al., 1998). A aparência mumificada do inseto causada pela produção de conídios em sua superfície é responsável pela denominação popular da doença como “muscardine verde” (ALVES, 1998). Uma característica particular da espécie *M. anisopliae* var. *acidum* é a ocorrência da conidiogênese no interior da cutícula do hospedeiro. Esta propriedade parece estar relacionada à proteção dos conídios contra a luz ultra-violeta do sol (LOMER et al., 2001).

O estudo detalhado das enzimas produzidas pelo gênero *Metarhizium* revelou uma série de proteases com atividade sobre a cutícula. Foram purificadas duas proteases alcalinas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, denominadas Pr1 (atividade tipo subtilisina) e Pr2 (atividade tipo tripsina). Análises através de inibidores enzimáticos indicaram que ambas possuem resíduos de serina e histidina no centro ativo. Apesar desta semelhança, Pr1 apresenta afinidade por aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) e apolares (alanina e glicina), enquanto Pr2 possui atividade sobre caseína e substratos sintéticos contendo arginina ou lisina (ST. LEGER et al., 1987).

A atividade da enzima Pr1 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* sobre proteínas cuticulares de *Manduca sexta* foi demonstrada através de estudos com inibidores de Pr1 e anticorpos IgG (específicos para Pr1). A presença destes inibidores

reduziu a taxa de mortalidade do inseto (ST. LEGER et al., 1988a). Posteriormente, utilizando o mesmo modelo de infecção, foi verificado que Pr1 foi a principal protease produzida por tubos germinativos e apressórios (ST. LEGER et al., 1989).

A atividade de Pr1 sobre diferentes tipos cuticulares também foi analisada, utilizando como modelo isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* cultivados em cutícula de *M. sexta* e *S. gregaria*. A cutícula foi extraída de diferentes partes do tegumento destes insetos, as quais compreendem tipos cuticulares com composição protéica e grau de esclerotização distintos. A hidrólise dos componentes cuticulares ocorreu em diferentes níveis, sugerindo uma hierarquia das diferentes partes dos insetos quanto à susceptibilidade à ação enzimática. A atividade de Pr1 na degradação não foi a mesma entre as cutículas de *M. sexta* e *S. gregaria*, sugerindo uma possível participação de Pr1 na especificidade de hospedeiros (GILLESPIE et al., 1998).

O papel da protease Pr2 no processo de infecção ainda não é bem compreendido. Em cultivo líquido de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi verificado que a produção de Pr2 ocorre anteriormente a Pr1, sugerindo que Pr2 atue precocemente na cutícula com liberação de peptídios indutores de Pr1 (PATERSON et al., 1994b; GILLESPIE et al., 1998).

A regulação da expressão das proteases Pr1 e Pr2 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* também foi estudada. Em substratos contendo fontes simples de carbono e nitrogênio a atividade de Pr1 foi reprimida enquanto a atividade de Pr2 ocorreu em níveis basais. Quando induzido o crescimento em substrato contendo cutícula de *S. gregaria*, sem qualquer outra de fonte de carbono e nitrogênio, a produção de Pr1 foi cerca de dez vezes maior. Isto sugere que a regulação das proteases cuticulares é

dependente da fonte de carbono e nitrogênio, e é induzida quando na presença de cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1988b; PATERSON et al., 1994a; PATERSON et al., 1994b; ST. LEGER et al., 1998).

A produção de Pr1 e Pr2 também apresenta um padrão diferencial de expressão em relação ao pH do ambiente. Independente do meio conter substrato indutível, ambas as enzimas só foram produzidas no pH que elas atuam (pH 8,0), embora o nível de produção tenha aumentado quando induzida por componentes da cutícula. No processo de penetração do fungo no hospedeiro, o pH da cutícula aumentou de 6,3 para 7,7, corroborando com o valor de regulação pelo pH na produção de Pr1 e Pr2 (ST. LEGER et al., 1998). Muito provavelmente a alcalinidade da cutícula representa um sinal fisiológico para a expressão destes fatores de virulência.

Trabalhando com o modelo de infecção de *M. anisopliae* var *anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus*, Moraes e colaboradores (2003) estudaram a regulação da produção de proteases e quitinases em meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Os maiores níveis de atividade das proteases secretadas (tipo-tripsina) foram determinados quando o fungo foi cultivado em meio contendo cutícula de carrapato como única fonte de carbono e nitrogênio. As quitinases secretadas demonstraram um padrão diferente de regulação quando comparado às proteases. Os maiores níveis de atividade quitinolítica foram encontrados em substratos contendo *N*-acetilglicosamina suplementado com quitina ou cutícula de carrapato. Na ausência de *N*-acetilglicosamina, níveis basais de atividade quitinolítica foram detectados, indicando que este monômero participa na indução das enzimas quitinolíticas. O papel das quitinases na patogenicidade ainda é pouco conhecido, mas sugere-se que participem tardiamente no processo de penetração através da cutícula

do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1996b; NAHAR et al., 2004). Várias quitinases de *M. anisopliae* já foram estudadas e caracterizadas quanto ao mecanismo de ação, especificidade de substratos e massa molecular (ST. LEGER et al., 1991a; ST. LEGER et al., 1996a; PINTO et al., 1997; BOGO et al., 1998; KANG et al., 1999; SCREEN et al., 2001; BARATTO et al., 2003; NAHAR et al., 2004).

Recentemente foi analisada a produção de proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) de sete isolados de *M. anisopliae* var. *acridum*, a partir do cultivo em meio contendo cutícula de *R. schistocercoides* e substratos não cuticulares (PINTO et al., 2002). O estudo revelou alta variabilidade entre os isolados quanto à produção das proteases e a influência do substrato cuticular na regulação das mesmas. Níveis de atividade enzimática mais elevados foram observados em meio contendo cutícula, principalmente proteases tipo Pr1. Estes resultados sugerem que a Pr1 produzida por *M. anisopliae* var. *acridum* desempenha um papel relevante na degradação de proteínas cuticulares, sendo provavelmente um determinante de patogenicidade, semelhante ao observado para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ST. LEGER et al., 1988a).

A atividade de proteases de dois isolados de *M. anisopliae* var. *acridum* (CG423 e CG442) também foi caracterizada na presença de inibidores de proteases e diferentes valores de pH e temperatura (PINTO, 1999). A análise revelou que o conjunto de proteases produzido por estes isolados tem atividade ótima em pH neutro e temperatura de 28°C. A partir da análise com inibidores proteolíticos, o conjunto de proteases ficou caracterizado por enzimas dos tipos serino-proteases, tripsina e cisteína-proteases.

Outras proteases também parecem estar envolvidas no processo de infecção. Para a espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi observada a produção de

duas aminopeptidases (CHARNLEY & ST. LEGER, 1991), uma metaloprotease (ST. LEGER et al., 1994), uma cisteína protease designada Pr4 (COLE et al., 1993), uma aspartil protease (ST. LEGER et al., 1998), uma carboxipeptidase (JOSHI & ST. LEGER, 1999), além de quatro isoformas da enzima Pr1 (Pr1A, Pr1B, Pr1E e Pr1F) e três isoformas de Pr2 (ST. LEGER, 1994).

Recentemente foi caracterizado o padrão de expressão gênica por ESTs ("Expressed Sequence Tags") de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* em condições de indução de enzimas envolvidas na patogenicidade. O padrão de ESTs revelou uma grande quantidade de proteases produzidas em ambas as espécies, incluindo subtilisinas, tripsinas, quimotripsinas, metaloproteases, aspartilproteases, aminopeptidases e carboxipeptidases (FREIMOSER et al., 2003).

Entre as subtilisinas produzidas por *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foram caracterizadas 7 novas isoformas de Pr1: Pr1C, Pr1D, Pr1G, Pr1H, Pr1I, Pr1J e Pr1G-K. Além das subtilisinas, foram caracterizadas proteínas de transporte, sinalização e toxigênicas, que possivelmente participam na defesa contra microrganismos oportunistas durante o processo de infecção. A análise quantitativa das seqüências expressas por *M. anisopliae* var. *anisopliae* indicou as subtilisinas e tripsinas como as enzimas mais abundantes nas condições de indução. Entretanto, foi caracterizado um padrão diferente de seqüências expressas por *M. anisopliae* var. *acridum*. Esta espécie produziu quitinases e proteases tipo subtilisina como as enzimas mais abundantes, além da ausência de tripsinas (FREIMOSER et al., 2003). Mesmo não sendo expressas, os genes de tais proteases foram amplificados por PCR (BAGGA et al., 2004). Isto sugere que as diferenças nos fatores de patogenicidade entre essas

espécies podem existir devido à regulação diferente do mesmo conjunto de genes, ao invés de variações no número e tipos de genes.

Diferenças claras nos perfis metabólicos também foram observadas a partir da análise das ESTs. Em geral, os genes necessários para a síntese e degradação da parede celular, metabolismo de carboidratos, resposta a stress ambiental, desintoxicação e transporte transmembrana foram comumente encontrados no perfil metabólico de *M. anisopliae* var. *acridum*. Por outro lado, as seqüências expressas mais abundantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foram de síntese de toxinas e controle do ciclo celular. Estas variações refletem as diferentes estratégias ecológicas das duas espécies. *M. anisopliae* var. *acridum* tem como característica invadir todos os tecidos do hospedeiro, levando o inseto à morte (INGLIS et al., 2001). A espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* mata o hospedeiro pela produção de toxinas, seguido de crescimento saprofítico no interior do inseto (SAMUELS et al., 1989).

A quantidade e diversidade de subtilisinas encontradas em *M. anisopliae* tem gerado novas concepções a cerca da interação *Metarhizium*-hospedeiro. Até o momento foram identificadas 11 e 7 subtilisinas em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, respectivamente. De acordo com análises de similaridade de seqüência e estrutura de íntron-exon, estas subtilisinas podem ser agrupadas em quatro grandes grupos: (I) Classe I, (II) Classe II subfamília-extracelular 1, (III) Classe II subfamília-extracelular 2, e (IV) Classe II subfamília-endocelular (Tabela 3).

Tabela 3. Grupos de subtilisinas de *M. anisopliae* (adaptado de BAGGA et al., 2004).

Classe	Subclasse	Subtilisinas
Classe I (tipo "bacteriana")	---	Pr1C
Classe II (tipo "proteínase K")	Subfamília-extracelular 1	Pr1A, Pr1B, Pr1G, Pr1I, Pr1K
	Subfamília-extracelular 2	Pr1D, Pr1E, Pr1F, Pr1J
	Subfamília-endocelular	Pr1H

O alinhamento das seqüências das subtilisinas (Pr1A a Pr1K) permitiu separar Pr1C das demais, uma vez que possui mais similaridade com subtilisinas de procariotos (*Bacillus* spp.). As demais subtilisinas apresentam maior similaridade com enzimas da família da proteinase K (BAGGA et al., 2004). As análises de seqüências destas subtilisinas suportam a idéia de que tenha ocorrido duplicação de genes ao decorrer da história evolutiva do gênero *Metarhizium*.

As várias isoformas de Pr1 podem ter divergido independentemente, especializando-se em diferentes funções. Presumidamente, as variadas subtilisinas podem participar de diferentes processos na patogenicidade, aumentar a adaptação e o número de hospedeiro, ou ainda, permitir a aquisição de novos nichos ecológicos. Por exemplo, a espécie *M. anisopliae* var. *acridum* ocupa menos habitats e infecta menos insetos que *M. anisopliae* var. *anisopliae*. A maior especialização de *M. anisopliae* var. *acridum* é coerente com o número reduzido de subtilisinas, sugerindo a perda da plasticidade patogênica desta espécie. *M. anisopliae* var. *anisopliae*, por outro lado, possui maior variedade de subtilisinas e também de hospedeiros (BAGGA et al., 2004).

A comparação de alinhamentos e taxas de similaridades das isoformas de Pr1, dentro da mesma linhagem e entre linhagens de *M. anisopliae*, mostrou que

minoácidos envolvidos na catálise das subtilisinas passaram por fortes pressões seletivas, enquanto as demais seqüências divergiram de forma neutra. Isto sugere que cada Pr1 contribui diferentemente no desenvolvimento da patogenicidade. Além disso, a comparação por homologia de seqüências indica que há diferenças nas funções das subtilisinas, como especificidade de substratos, estabilidade alcalina e propriedades de adsorção à cutícula. Muito provavelmente, cada isoforma de Pr1 constitui um determinante de patogenicidade (BAGGA et al., 2004).

2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Por **transformação genética** compreendem-se os processos de inserção de moléculas de DNA exógeno em células hospedeiras, com a finalidade de alteração genotípica do organismo receptor e/ou expressão deste DNA exógeno. A transformação genética permite o estudo de determinados aspectos da biologia molecular de praticamente qualquer organismo vivo. Os procariotos (incluindo Gram-positivos, Gram-negativos e algumas espécies de *Archaea*) e fungos leveduriformes são, até o momento, os únicos organismos conhecidos a apresentarem naturalmente o processo de transformação (SMITH & DANNER, 1981; SOWERS & SCHREIER, 1999). Entretanto, mesmo dentro de um gênero, apenas algumas linhagens são capazes de efetuarem transformação.

No contexto dos fungos entomopatogênicos, o desenvolvimento de metodologias de transformação é atraente, por exemplo, para a elaboração de estratégias efetivas de melhoramento genético, capazes de gerar resultados de

interesse no controle biológico (AZEVEDO, 1998). Através da transformação genética, é possível incorporar genes repórteres que permitam a distinção entre microrganismos aplicados e populações endógenas. Pode-se alterar determinadas características fenotípicas de um microrganismo tornando-o mais efetivo como agente de controle biológico, principalmente através da alteração do fenótipo de determinantes de virulência.

Hinnen e colaboradores (1978) propuseram, a partir da análise de fragmentos de restrição, três modelos para explicar os eventos de integração do DNA exógeno (marcador auxotrófico para leucina) no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*:

- (I) Integração homóloga ou do tipo I: quando o transformante contém o alelo selvagem e mutante juntamente com o vetor que carrega o DNA exógeno, arranjados em *tandem*;
- (II) Integração heteróloga (ilegítima, ectópica) ou do tipo II: quando os transformantes não apresentam modificações de restrição nas proximidades do alelo mutante, assim a seqüência de DNA contendo o alelo selvagem é integrado em regiões aleatórias do genoma, através da permuta simples entre esta seqüência e o sítio não-homólogo;
- (III) Integração por substituição homóloga ou do tipo III: quando os transformantes não apresentam modificações no fragmento de restrição, mas simplesmente substituem o alelo mutante pelo selvagem, através de recombinações homólogas entre o cromossomo e o DNA transformante. Estes três tipos de integração têm sido relatados em transformantes de diversas espécies de fungos filamentosos, independente da metodologia de transformação utilizada (WADA et al., 1996; ULHOA et al., 1992; FUNGARO et al., 1997, dentre outros).

O primeiro relato de transformação genética em fungos filamentosos foi para o ascomiceto *Neurospora crassa* (CASE et al., 1979) utilizando o gene que

confere prototrofia para quinonas (*qa-2+*). Alguns anos mais tarde, *Aspergillus nidulans* foi transformado com o gene codificador para acetamidase (TILBURN et al., 1983).

2.3.1 Marcadores de seleção

O desenvolvimento de uma metodologia de transformação genética envolve vetores contendo genes marcadores, os quais permitem a seleção das células que receberam o DNA exógeno. Existem vários genes marcadores utilizados na transformação genética, sendo eles divididos em dois grupos: (I) marcadores auxotróficos, e (II) marcadores de resistência a inibidores de crescimento (VAN DEN HONDEL & PUNT, 1990).

O fundamento dos marcadores de auxotrofia consiste no uso de genes para complementar mutações ou outras deficiências naturais em processos bioquímicos na linhagem a ser transformada. Este princípio implica que haja um gene tipo selvagem no vetor de transformação e a mutação correspondente na linhagem receptora. Os genes mais utilizados como marcadores auxotróficos são de enzimas do metabolismo primário, como *pyrG* e *pyr-4* (biossíntese de pirimidinas), *trpC* (metabolismo do triptofano) e *argB* (biossíntese de arginina) (OAKLEY et al., 1987; YELTON et al., 1984; JOHN & PEBERDY, 1984; D'ENFERT, 1996). Apesar disso, genótipos naturalmente mutantes para características básicas nem sempre são comuns, exigindo a obtenção de mutantes naturais ou induzidos para tais características. Uma alternativa a este contexto compreende a seleção de mutantes espontâneos para o gene da nitrato redutase (*niaD*). Os mutantes são obtidos por seleção natural em meio contendo clorato

(um análogo funcional do nitrato), cujo produto de degradação é extremamente tóxico para a célula. Ainda assim, nem todas as espécies são sensíveis ao clorato, tornando este método pouco conveniente para algumas espécies de fungos.

Os marcadores de resistência, também conhecidos como marcadores dominantes, atuam aumentando o nível de resistência da linhagem contra antibióticos e outras drogas. Este sistema dispensa a laboriosa obtenção de mutantes para características nutricionais do sistema auxotrófico, mas exige que a linhagem seja sensível, ou parcialmente sensível, a determinado antibiótico (RUIZ-DÍEZ, 2002).

Os marcadores de resistência mais empregados consistem de genes clonados de procariotos, onde se destacam genes de resistência a bleomicina (*bleo*), fleomicina (*ble*) e higromicina-B (*hph*) (AUSTIN et al., 1990; DROCOURT et al., 1990; GRITZ & DAVIES, 1983). Este último vem sendo amplamente utilizado para transformar fungos filamentosos através do sistema *Agrobacterium tumefaciens*. Marcadores provenientes de eucariotos também são conhecidos, como o gene de resistência a oligomicina (*oliC31*) e ao fungicida benomil (*bml*) (WARD et al., 1988; ORBACH et al., 1986).

O benomil (Figura 1), assim como outros benzimidazóis, atua inibindo a polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, impedindo a divisão mitótica da célula. Os microtubulos são constituídos de dímeros das proteínas globulares α -tubulina e β -tubulina, unidas por ligações não-covalentes. O benomil tem afinidade pela β -tubulina e quando ligado impede a formação do heterodímero. A mitose de mamíferos e plantas tem demonstrado sensibilidade ao composto colchicina, mas não ao benomil, o que tem estimulado o uso deste último como fungicida na agricultura (GRIFFIN, 1994).

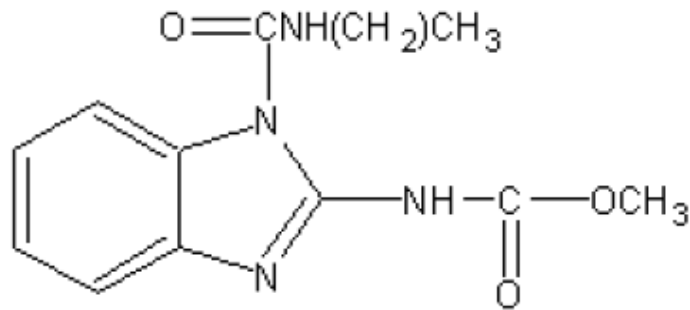


Figura 1. Fórmula estrutural do fungicida benomil.

Os genes que conferem resistência ao benomil foram clonados de várias espécies fúngicas. A resistência foi caracterizada como mutações que levaram a alteração de aminoácidos em sítios de ligação com o benomil, como os sítios 6 (His → Leu/Tyr), 165 (Ala → Val), 167 (Phe → Tyr), 198 (Glu → Asp/Gln/Lis/Ala/Gly) e 200 (Phe → Tyr) (ORBACH et al., 1986; JUNG & OAKLEY, 1990; SEIP et al., 1990; JUNG et al., 1992; KOENRAADT et al., 1992; COOLEY & CATEN, 1993; GOLDMAN et al., 1993). O gene de resistência ao benomil clonado de *Neurospora crassa* (*bml*, 167 Phe → Tyr) vem sendo utilizado com sucesso nos sistemas de transformação de muitos fungos filamentosos (ORBACH et al., 1986; BERNIER et al., 1989; BOGO et al., 1996; FURLANETO et al., 1999).

2.3.2 Metodologias de transformação genética

O processo de transformação genética pode ser dividido em três etapas principais: (I) indução da competência da célula hospedeira; (II) introdução do DNA

exógeno e (III) seleção das células transformadas (MULLINS & KANG, 2001). A metodologia utilizada na introdução do DNA exógeno está diretamente vinculada ao tipo de célula hospedeira. Para fungos filamentosos, as metodologias de transformação compreendem a obtenção de protoplastos, seguido de tratamento químico ou eletroporação; ou o emprego de conídios intactos através da biobalística e, mais recentemente, o uso da capacidade natural de transferência genética da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

Os protoplastos são células desprovidas de parede obtidas artificialmente a partir da digestão enzimática da parede celular. Parte-se do princípio que a entrada do DNA exógeno é facilitada pela ausência da parede, como acontece na transformação de células vegetais (GAD et al., 1990). Sem a parede os protoplastos estão sujeitos a lise osmótica, e assim faz-se necessário a presença de um estabilizador osmótico. Após a entrada do DNA exógeno, os protoplastos devem ser incubados em meios seletivos específicos, adicionados do estabilizador osmótico para promover a regeneração da hifa. Uma série de compostos podem ser utilizados como estabilizadores osmóticos e os mais comuns são sais orgânicos, carboidratos e álcoois de açúcares (PEBERDY, 1979). Os estabilizadores mais comuns são o KCl 0,7 M, sorbitol 1,2 M e a sacarose 0,6 M. O composto estabilizador é preparado em solução tampão, sendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5-8,0) um dos agentes tamponantes mais empregados (BOGO et al., 1996; BARRETO et al., 1997; SOUZA et al., 2000; SUN et al., 2001).

A entrada do DNA transformante é promovida pelo tratamento dos protoplastos com íons cálcio (CaCl_2) e pela ação caotrópica do composto polietilenoglicol (PEG). A suspensão de protoplastos (em estabilizador osmótico e

tampão) é misturada ao cloreto de cálcio, PEG e o DNA exógeno. O cloreto de cálcio é capaz de neutralizar a carga negativa da membrana celular, enquanto o PEG proporciona a interação das moléculas de DNA com os protoplastos (BALLANCE & TURNER, 1985). É comum ocorrer a fusão de protoplastos em solução, e acredita-se que é neste momento que o DNA é incorporado. Opcionalmente, pode-se incluir na mistura o ácido aurintricarboxílico (ATA), com a finalidade de inibir a ação de nucleases do hospedeiro (CANTONE & VANDENBERG, 1999).

Um procedimento adicional ao sistema protoplasto-PEG é a incorporação de endonucleases de restrição à mistura de transformação. Descrito pela primeira vez por Schiestl e Petes (1991) em *Saccharomyces cerevisiae*, este procedimento é conhecido como Integração Mediada por Endonuclease de Restrição (Restriction Enzyme-Mediated Integration – REMI). As endonucleases clivam o cromossomo do hospedeiro em sítios específicos, assim como o vetor que contém o DNA transformante (em sítios externos ao gene de interesse), facilitando a integração do DNA no genoma do hospedeiro. Em cada sistema, existem condições ótimas para a obtenção de maior número de transformantes. No caso do REMI, o tipo e a quantidade de endonuclease de restrição (medido em Unidades) são variáveis críticas para o sucesso da técnica.

A eletroporação baseia-se na ação da corrente elétrica de alta voltagem para formar poros na membrana dos protoplastos, facilitando a entrada do DNA transformante. Quando o pulso de voltagem é aplicado ao protoplasto, os componentes da membrana ficam polarizados, gerando uma diferença de potencial através da membrana. Quando este potencial ultrapassa um limiar de voltagem, ocorrem microrupturas na membrana celular. A célula torna-se permeável a compostos

exógenos como o DNA transformante, desde que excedam repulsões eletrostáticas presentes no momento do pulso (WATTS & STACEY, 1990). Os primeiros relatos da transformação de fungos filamentosos via eletroporação são do final da década de 80, sendo *Fusarium solani* e *A. nidulans* as primeiras espécies transformadas (RICHEY et al., 1989). São vários os trabalhos que descrevem este sistema de transformação em diferentes espécies fúngicas (GOLDMAN et al., 1990; CHAKRABORTY et al., 1991; PFEIFER & KHACHATOURIANS, 1992; ST. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996). Embora tenha permitido a obtenção de um maior número de transformantes em relação ao PEG/CaCl₂, o sucesso da técnica de eletroporação exige otimizações na voltagem de transformação. Parâmetros a serem analisados incluem ainda o tamanho da célula alvo, a viabilidade após o choque elétrico e a condutividade do meio de eletroporação (GOLDMAN et al., 1990).

As estratégias de transformação que envolvem protoplastos fúngicos têm sido as mais utilizadas, entretanto possuem uma série de desvantagens metodológicas. A protoplastização é um processo demorado e laborioso, exigindo a otimização de várias etapas. As variáveis mais relevantes são o tipo de composto lítico, o estabilizador osmótico e o tempo de digestão da parede celular. Além disto, nem sempre o estabilizador osmótico é adequado para ambas obtenção e regeneração dos protoplastos. Ainda mais, o PEG exibe um comportamento citotóxico para células e sua concentração pode impedir a regeneração dos protoplastos. Para o REMI, a maior desvantagem está na aplicação desta técnica para a obtenção de mutantes insercionais. Apesar de descrita com este objetivo para várias espécies fúngicas, uma fração considerável dos mutantes (20 – 100%) parecem advindos de rearranjos no cromossomo pelo efeito das endonucleases (MULLINS & KANG, 2001). No caso da

metodologia de eletroporação, além das otimizações de voltagem e protoplastização, os eletroporadores são equipamentos caros e nem sempre viáveis para todos os laboratórios.

A eficiência dos sistemas de transformação foi aumentada quando Sanford e colaboradores (1987) propuseram uma nova metodologia de transformação, posteriormente denominada de biobalística. Seu fundamento baseia-se na aceleração de partículas de alta densidade (ouro ou tungstênio), envoltas por DNA exógeno, contra as células hospedeiras. Como o microprojétil ultrapassa a parede da hifa ou conídio, este método dispensa a obtenção de protoplastos. Além disto, o projétil é capaz de atingir diretamente o núcleo e, portanto, não estaria sujeito à ação de nucleases citoplasmáticas (BARRETO et al., 1997). Entre os fatores físicos envolvidos na eficiência da biobalística, pode-se citar a constituição da micropartícula, tamanho, concentração e o procedimento utilizado para ligar o DNA a ela. Os parâmetros biológicos que afetam a eficiência incluem o genótipo da célula alvo, a fase de crescimento, densidade no meio e a composição osmótica do meio durante o bombardeamento (ARMALEO et al., 1990). O primeiro relato da transformação de fungos por biobalística foi com a levedura *S. cerevisiae* (ARMALEO et al., 1990) e posteriormente foi aplicada com sucesso para transformar diversos fungos filamentosos (HILBER et al., 1994; ST. LEGER et al., 1995; FUNGARO et al., 1995; BOGO et al., 1996; CHAURE et al., 2000; INGLIS et al., 2000; SUNAGAWA & MAGAE, 2002).

Recentemente foi demonstrada a capacidade da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* em transferir DNA para leveduras (BUNDOCK et al., 1995) e fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998).

2.4 O SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Agrobacterium é um bacilo aeróbico, gram-negativo, flagelado, pertencente a classe das α -proteobactérias e família Rhizobiaceae que inclui, entre outros, gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium* (LIPP-NISSINEN, 1993). No gênero *Agrobacterium*, as espécies *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* destacam-se por serem patógenos de diversas espécies de vegetais, causando a doença popularmente conhecida como “galha da coroa” e a síndrome da “raiz em cabeleira”, respectivamente. O sintoma mais característico destas doenças é a formação de um tumor na região infectada por *Agrobacterium*. A formação deste tumor é causada, a princípio, através da capacidade natural de transformação genética do *Agrobacterium* (GELVIN, 2003).

Em condições naturais, a bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti (“Tumor inducing”) para a célula vegetal infectada. Esta seqüência de DNA que é transferida (T-DNA) é capaz de se integrar eficientemente no genoma da planta hospedeira. O fragmento de T-DNA contém genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios (NAM et al., 1997; TINLAND, 1996), responsáveis pela formação do tumor e sobrevivência da bactéria.

Os hormônios vegetais sintetizados – ácido indol acético (auxina) e isopentenil-AMP (citocinina) – induzem um desequilíbrio hormonal, que tem como conseqüência uma multiplicação descontrolada das células vegetais, resultando na formação do tumor (GELVIN, 2003).

As opinas produzidas no processo de infecção são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio para o *Agrobacterium*, e estão especificamente relacionadas com a linhagem bacteriana inoculada. Desta forma, a bactéria cria para si um nicho favorável pela modificação genética das células da planta, sendo este processo denominado “colonização genética” (HOOYKAAS & BEIJERSBERGEN, 1994). As linhagens de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opina produzida. As opinas estão agrupadas em quatro famílias: octopina, nopalina, manopina e agrocinopina. Já foram identificados mais de 20 tipos diferentes de opinas, sendo a octopina [N_2 -(1,3-dicarboxietil)-L-arginina] e nopalina [N_2 -(1,3-dicarboxipropil)-L-arginina] os tipos mais comuns (WEISING & KAHL, 1996).

O mecanismo natural de transferência de genes entre *Agrobacterium* e plantas ainda não é totalmente compreendido, mas grande parte da base molecular envolvida neste processo já foi caracterizada.

As linhagens de *A. tumefaciens* são divididas em três grupos principais, que variam entre si quanto as espécies de plantas hospedeiras, características metabólicas e estrutura genômica, sendo que o grupo da linhagem C58 é o mais estudado. Seu genoma é formado basicamente por um cromossomo circular (2,84 Mpb), um cromossomo linear (2,07 Mpb), e dois megaplasmídeos: pAtC58 (542,8 Kpb) e pTiC58 (214,2 Kpb). Os genes envolvidos na transformação e na tumorigênese estão localizados nos quatro elementos genéticos (WOOD et al., 2001).

O plasmídeo Ti (pTiC58) pode ser dividido em duas regiões principais: a região de virulência (*vir*) e a região de T-DNA (“Transferred DNA”). Além destas duas regiões, o plasmídeo Ti possui genes de replicação e incompatibilidade (*ori* e *inc*),

catabolismo de opina (*opc*) e função de conjugação (*tra*), sendo nenhuma destas seqüências necessárias à virulência (HOOYKAS & BEIJERSBERGEN, 1994).

A região de virulência é composta por um *cluster* gênico (denominados de genes *vir*) e é responsável pela regulação da transferência do T-DNA. Esse conjunto de operons possui aproximadamente 40 Kpb e está localizado adjacente à borda esquerda do T-DNA (HOOYKAS & BEIJERSBERGEN, 1994). As unidades transcricionais dos genes *vir* são denominadas *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* e *virH*. Somente quatro locos *vir* são essenciais para a formação do tumor (*virA*, *virB*, *virD* e *virG*), enquanto os outros afetam somente a eficiência da transferência (WEISING & KAHL, 1996).

A região de T-DNA é a única parte do plasmídeo transferida para a célula hospedeira. É esta região que abriga os oncogenes (*onc*) responsáveis pela produção de fitohormônios. O tamanho do T-DNA varia de 10 a 30 Kb e é limitada por duas seqüências de 25 pb denominadas borda direita (RB – “Right Border”) e borda esquerda (LB – “Left Border”). Estas bordas são seqüências altamente homólogas e estão orientadas de forma diretamente repetida (GELVIN, 2003).



Figura 2. Seqüências flanqueadoras do T-DNA. RB – borda direita; LB – borda esquerda; A – adenina; T – timina; C – citosina; G – guanina. Em vermelho: nucleotídeos homólogos

A presença destas seqüências é que define o tamanho do T-DNA, e experimentos demonstraram que a borda direita é essencial para que a transferência ocorra (WANG et al., 1984).

2.4.1 Mecanismo de transferência do T-DNA

O processo de infecção e transferência do T-DNA ocorre por uma série de etapas: quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA até o núcleo e integração do T-DNA no genoma (SHENG & CITOVSKY, 1996; ZIEMIENOWICZ, 2001; GELVIN, 2003).

O primeiro evento do processo de transferência ocorre quando um tecido da planta sofre injúria, liberando diferentes moléculas para o ambiente. Algumas destas moléculas são capazes de atuar como sinalizadoras, promovendo quimiotaxia positiva para o *Agrobacterium*. Estes sinalizadores foram identificados principalmente como compostos fenólicos tais como acetoseringona, ácido *p*-hidroxibenzóico e vanilina, embora existam relatos que alguns açúcares e aminoácidos também possam atuar como quimiotáticos (HAWES et al., 1988). Independente da molécula sinalizadora, o processo de reconhecimento e quimiotaxia do *Agrobacterium* é dependente dos genes *virA* e *virG*, presentes no plasmídeo Ti (SHAW et al., 1988).

O locus *virA* é constitutivamente expresso e o seu produto (VirA), localizado na membrana interna das células de *Agrobacterium*, funciona como um quimiorreceptor para as moléculas sinalizadoras da planta. Após a aproximação da

bactéria até a região onde ocorreu a injúria no tecido vegetal, dá-se início a adesão entre as células.

O processo de adesão envolve moléculas receptoras tanto na planta como na superfície do *Agrobacterium*. O receptor bacteriano é um polissacarídeo rico em β -glucanas ancorado no lipopolissacarídeo da parede celular, enquanto os receptores de superfície na planta foram caracterizados como pectinas, proteínas tipo-vitronectina e tipo-germina (MATTHYSSE & KINJE, 1998). A vitronectina é um componente da matriz extra-celular de células animais e é utilizada como receptor de superfície por várias linhagens de bactérias patogênicas (PAULSSON & WADSTROM, 1990). É provável que as proteínas tipo-vitronectina das plantas estejam envolvidas na adesão celular de *Agrobacterium*-planta, uma vez que a adesão entre estas células foi inibida em presença de anticorpos anti-vitronectina (WAGNER & MATTHYSSE, 1992). Curiosamente, embora as vitronectinas vegetal e animal estejam imunologicamente relacionadas, elas não compartilham similaridades na seqüência de aminoácidos (ZHU et al., 1994).

Os genes envolvidos na adesão de *A. tumefaciens* à planta estão localizados no cromossomo circular bacteriano, e incluem *chvA*, *chvB*, *pscA*, *attA-Z* e *celABCDE* (ZIEMIENOWICZ, 2001; MATTHYSSE et al., 2000). O produto dos genes *chvA* e *chvB* promovem a síntese de β -1,2 glucanas e o gene *pscA* (*exoC*) codifica enzimas responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos. A função exata do produto dos genes *attA-Z* ainda não é conhecida, mas a presença de um grande número de genes envolvidos no processo de adesão sugere que a habilidade de *A. tumefaciens* em ligar-se às células hospedeiras seja importante para a transferência do T-DNA (MATTHYSSE et al., 2000).

Uma vez aderida à célula hospedeira, a bactéria sintetiza microfibrilas de celulose (genes *ceIABCDE*) que formam uma rede para ancorar o *Agrobacterium* à região de injúria no tecido vegetal. Esta rede de microfibrilas promove a agregação de muitas células bacterianas na superfície do hospedeiro (MATTHYSSE, 1983). O evento de adesão à célula hospedeira é essencial para ocorrer a transferência de genes (MATTHYSSE et al., 2000). Esta etapa marca o início da transferência do T-DNA para a planta, através de uma série de reações sinalizadoras para a expressão dos genes de virulência bacteriano.

Ao se ligar à molécula indutora, a proteína VirA é autofosforilada e torna-se “ativada”. Nesta condição, a proteína VirA modifica a proteína VirG (que também é expressa constitutivamente, mas em menor escala) através da fosforilação da mesma. A proteína VirG fosforilada atua como ativador transcricional dos genes *vir*, através da ligação no *vir*-box, uma seqüência de 12 pb presente nos promotores desses genes (GELVIN, 2003). Recentemente foi investigado a função do plasmídeo pAtC58 sobre a virulência de *A. tumefaciens* C58. A participação deste plasmídeo na virulência de *A. tumefaciens* era supostamente nula, mas ficou comprovado que genes do pAtC58 estão envolvidos na regulação da expressão dos genes *vir* de pTiC58 (NAIR et al., 2003).

Com a indução da expressão dos genes *vir*, dá-se início a montagem do “complexo-T” (a molécula final de T-DNA associada a diversas proteínas), a partir da síntese de uma cópia fita simples do T-DNA. Este processo é dependente das proteínas VirD1 e VirD2, duas proteínas do operon *virD*. Estas proteínas são capazes de reconhecer as bordas esquerda e direita do T-DNA. A proteína VirD2 hidrolisa a ligação fosfodiéster da fita inferior, entre o 3° e 4° nucleotídeo de cada borda, e conseqüentemente gera um segmento fita simples do T-DNA. Este fragmento de T-DNA

fita simples é removido do plasmídeo Ti, que por sua vez é reparado através da incorporação de novos nucleotídeos. Em seguida, a proteína VirD2 permanece covalentemente ligada à extremidade 5' do T-DNA. A presença desta proteína está relacionada com a polarização do complexo-T. A função exata da proteína VirD1 ainda é desconhecida, mas é sugerido que tenha atividade semelhante a topoisomerase I (GHAI & DAS, 1989). A etapa final no processamento do T-DNA envolve as proteínas VirC1 e VirC2. VirC1 é capaz de ligar-se ao sítio “overdrive”, localizado adjacente à borda direita, aumentando a atividade enzimática de VirD1/VirD2 (GELVIN, 2003).

A montagem do complexo-T é finalizada com a associação de proteínas VirE2 ao conjunto T-DNA/VirD2. Várias cópias desta proteína ligam-se ao longo da molécula de T-DNA, sem especificidade de seqüências (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995). Diversas funções foram associadas a esta proteína, incluindo proteção da fita de T-DNA contra nucleases do hospedeiro e formação do canal de transporte de T-DNA (GELVIN, 2003). Análises do complexo-T através de microscopia eletrônica revelou que esta molécula exibe uma estrutura helicoidal semelhante a um solenóide (CITOVSKY et al., 1997; ABU-ARISH et al., 2004).

A transferência do complexo-T até a planta é mediada por um *pilus* do *Agrobacterium*, semelhante ao encontrado no sistema de conjugação bacteriana (FULLNER et al., 1996). Esse *pilus* é formado por proteínas VirB, sendo VirB2 a subunidade maior. O *pilus* é ancorado à membrana externa da célula bacteriana através da proteína VirB7. O complexo-T é acoplado ao *pilus* através da proteína VirD4, localizada na membrana interna da bactéria, e é transferido até o citoplasma da célula hospedeira.

No citoplasma do hospedeiro, o complexo-T é direcionado para o núcleo através de sinais de localização nuclear (SLN). Estes sinais, presentes nas proteínas VirD2 e VirE2, são reconhecidos por proteínas da membrana nuclear, como a importina- α e proteínas Ran. Uma vez reconhecido, o complexo-T é incorporado para o interior do núcleo da célula hospedeira (ZIEMIENOWICZ, 2001).

A internalização do complexo-T é um evento ainda não esclarecido. A proteína VirD2 supostamente confere polarização para o complexo-T interagir com as importinas. O papel de VirE2 no transporte nuclear do T-DNA ainda é bastante controverso. No interior das células de *Agrobacterium*, VirE2 provavelmente interage com a chaperonina VirE1, tornando-se incapaz de se ligar à fita simples de T-DNA. Contudo, quando VirE2 está ligada ao T-DNA, este assume a forma estrutural de um solenóide-helicoidal. Suspeita-se que esta conformação possa ser necessária para a internalização do complexo-T no núcleo do hospedeiro. A molécula do complexo-T é um conjunto nucleoprotéico extremamente grande, uma vez que o T-DNA pode conter até 150 Kb de extensão (HAMILTON, 1996). Além disso, aproximadamente 600 moléculas de VirE2 ligam-se ao longo do T-DNA, conferindo a este um comprimento de aproximadamente 3600 nm. A molécula final do complexo-T possui cerca de 5×10^7 Daltons de massa e 60 vezes a espessura da membrana nuclear. No contexto de toda a estrutura desta molécula, é possível que a proteína VirE2 seja fundamental para a internalização do complexo-T. Além de estabelecer a ultraestrutura helicoidal ao T-DNA, a presença de VirE2 ao longo de todo o seu comprimento permite que os poros da membrana nuclear estejam abertos em ambos os meios núcleo e citoplasmático (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995).

No núcleo da célula vegetal, o T-DNA é integrado ao genoma por recombinação ilegítima (GHEYSEN et al., 1991; ZIEMIENOWICZ, 2001) ou, menos freqüentemente, por recombinação homóloga (LEE et al., 1990). De acordo com o modelo atual (TINLAND & HOHN, 1995), a integração tem início quando a região 3' do T-DNA encontra homologia e forma um pareamento em algum sítio do DNA vegetal. Os nucleotídeos pareados sofrem restrição por nuclease(s). Em seguida, a extremidade 5'-VirD2 também pareia com o DNA vegetal e é ligado na terminação 3'-OH deste. A fita superior do DNA vegetal é degradada e a maquinaria de reparo do DNA sintetiza a fita complementar do T-DNA, finalizando o processo de integração. As proteínas envolvidas na integração do T-DNA ainda não são conhecidas, mas há evidências para que VirD2 atue como integrase ou ligase (ZIEMIENOWICZ, 2001). Fatores da célula hospedeira também participam do evento de integração, a exemplo da histona H2A (MYSORE et al., 2000). O processo de interação *Agrobacterium*-planta, assim como as principais proteínas envolvidas, está resumido na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo dos processos celulares envolvidos na interação *Agrobacterium*-planta (adaptado de SHENG & CITOVSKY, 1996).

Processo celular	Evento da interação <i>Agrobacterium</i> -planta	Proteínas de <i>Agrobacterium</i> envolvidas no processo ¹
Reconhecimento célula-célula	Adesão do <i>Agrobacterium</i> a receptores de superfície do hospedeiro.	ChvA, ChvB, PscA, Att
Transdução de sinal	Reconhecimento de moléculas sinalizadoras da planta e ativação da via de transporte do T-DNA.	ChvE, VirA, VirG [P21, P10]
Ativação transcricional	Expressão dos genes <i>vir</i> após fosforilação do ativador transcricional	VirG
Metabolismo de conjugação do T-DNA	<i>Nick</i> nas bordas do T-DNA e mobilização da cópia de T-DNA fita-simples	VirD1, VirD2, VirC1, [VirD3]
Transporte celular ²	Formação do complexo-T (proteínas/T-DNA) e do canal transmembrana; transporte do complexo-T para o citoplasma da célula hospedeira	VirE2, VirE1, VirD2, VirD4, VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, [VirB1, e outras proteínas VirB]
Importe nuclear	Interação com receptores da membrana nuclear da célula hospedeira e transporte do complexo-T através de poros da membrana nuclear.	VirD2, VirE2
Integração do T-DNA	Integração do T-DNA no genoma da célula hospedeira e síntese da fita complementar	[VirD2, VirE2]

1 As proteínas cuja participação é proposta, mas ainda não comprovada, estão indicadas entre colchetes.
 2 Proteínas VirB estão envolvidas na formação de um canal transmembrana e possivelmente na transferência do complexo-T. Proteínas VirE e VirD estão envolvidas na formação do complexo-T e provavelmente participam no transporte do complexo-T através do canal de VirB.

2.4.2 *Agrobacterium tumefaciens* como ferramenta de transformação genética

O principal avanço que permitiu a utilização de *Agrobacterium* como mediador de transformação genética foi a descoberta que a substituição dos oncogenes

do T-DNA por genes de interesse não inibe o mecanismo natural de transferência. Desta forma, a primeira demonstração real de que a interação *Agrobacterium*-planta poderia resultar em sistemas eficientes de transformação foi a introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo (HERRERA-ESTRELLA et al., 1983), confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*. Desde então, esta metodologia foi aplicada com sucesso para inúmeras espécies vegetais (GELVIN, 2003).

Os plasmídeos utilizados para sistemas de transformação via *Agrobacterium* são chamados de vetores desarmados, isto é, não possuem os oncogenes do T-DNA, mas conservam os genes de virulência (região *vir*). Os vetores podem ser divididos em dois sistemas: sistema cointegrado (sistema *in cis*) no qual os genes *vir* e o T-DNA modificado estão no mesmo replicon (ZAMBRYSKI et al., 1983) e sistema binário (sistema *in trans*), onde o T-DNA modificado é mantido em um plasmídeo distinto do Ti (HOEKMA et al., 1983).

O sistema de vetores binários tem sido a estratégia mais utilizada na transformação via *Agrobacterium*. Estes vetores apresentam tamanho muito reduzido quando comparado ao plasmídeo Ti desarmado, facilitando sua manipulação *in vitro*. Além disto, possuem seqüências *ori* (origem de replicação bacteriana), marcadores de resistência a antibióticos e sítios únicos para endonuclases de restrição dentro da seqüência de T-DNA. Estas características permitem a manipulação do vetor binário em *Escherichia coli* contendo praticamente qualquer seqüência clonada entre as bordas esquerda e direita. Atualmente existem várias construções de vetores binários, os quais variam em tamanho, sítios de restrição, marcador de seleção, origem de replicação e outras propriedades (Tabela 5).

Tabela 5. Vetores binários utilizados no sistema de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (adaptado de KLEE, 2000).

Vetor	Tamanho (Kb)	Sítios únicos de restrição ¹	LacZ	Marcador de seleção ²	Origem de replicação	
					<i>Agrobacterium</i>	<i>E. coli</i>
pBIN19	11,777	9	Sim	Canamicina (RB)	pRK2	pRK2
pC22	17,500	2	Não	Ampicilina (RB)	pRi	ColE1
pGA482	13,200	7	Não	Tetraciclina (RB)	pRK2	ColE1
pPCV001	9,200	6	Não	Ampicilina (RB)	pRK2	ColE1
pCGN1547	14,440	5	Sim	Gentamicina (LB)	pRi	ColE1
pJJ1881	25,700	4	Não	Tetraciclina (LB)	pRK2	pRK2
pPZP111	8,909	9	Sim	Clorafenicol (LB)	pVST	ColE1
pGREEN0029	4,632	18	Sim	Canamicina (LB)	pSa	pUC

¹ Sítios únicos de restrição entre as bordas esquerda e direita.

² Em parênteses está indicado a borda adjacente ao marcador de seleção.

Legenda: LacZ - gene da subunidade α da enzima β -galactosidase para seleção de clones por α -complementação; LB - borda esquerda; RB - borda direita.

A escolha do vetor binário adequado, assim como da linhagem bacteriana, pode ser decisiva para uma transformação genética eficiente.

A eficiência das linhagens de *Agrobacterium* está diretamente associada ao *background* cromossômico e ao plasmídeo Ti desarmado. As linhagens C58 são as mais utilizadas na transformação de plantas e atualmente existem muitas variantes com plasmídeos Ti selvagem e desarmado (KLEE, 2000).

A gama de hospedeiros que o *Agrobacterium* pode infectar pode variar de acordo com a linhagem bacteriana. A base molecular que envolve a especificidade de hospedeiros ainda não foi completamente determinada, entretanto existem trabalhos

indicando que genes do plasmídeo Ti tenham um papel mais relevante no reconhecimento de hospedeiros (LOPER & KADO, 1979; THOMASHOW et al., 1980). Os genes *virC*, *virF* e *virH* foram fundamentais para determinar as espécies vegetais susceptíveis à infecção e formação do tumor. Outros genes *vir*, incluindo *virG*, contribuem para a hipervirulência de algumas linhagens bacterianas. Entretanto, o processo de especificidade de hospedeiros é controlado por múltiplos fatores genéticos, tanto da bactéria quanto da planta (GELVIN, 2003).

Algumas linhagens de *Agrobacterium* foram modificadas para aumentar a eficiência de transformação. A principal alteração pode ser relacionada à expressão do gene *virG*, que é responsável pelo controle de todos os outros genes *vir*. Outra modificação importante foi o aumento na expressão de *virE1*, cujo produto é capaz de ligar-se ao T-DNA, protegendo-o da ação de endonucleases do hospedeiro (KLEE, 2000).

2.4.3 Transformação genética de fungos via *Agrobacterium tumefaciens*

Em meados de 1995, Bundock e colaboradores descreveram o primeiro relato de transformação genética de fungos via *A. tumefaciens* (agro-transformação). Simulando *in vitro* o sistema natural de transformação vegetal, estes pesquisadores conseguiram transformar eficientemente a levedura *S. cerevisiae* com o gene *ura3* (biossíntese da uracila). Posteriormente, De Groot e colaboradores (1998) estenderam a agro-transformação para várias espécies de fungos filamentosos. Desde então o número de espécies fúngicas transformadas via *Agrobacterium* vem crescendo progressivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Espécies de fungos filamentosos transformadas via *A. tumefaciens*.

Espécie fúngica	Autores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BUNDOCK et al. (1995, 1996, 2002); PIERS et al. (1996); VAN ATTIKUM et al. (2001 e 2003)
<i>Aspergillus awamori</i>	DE GROOT et al.(1998); GOUKA et al.(1999); MICHIELSE et al. (2004a, 2004b, 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	DE GROOT et al. (1998)
<i>Colletotricum gloesporioides</i>	DE GROOT et al. (1998)
<i>Fusarium venatum</i>	DE GROOT et al. (1998)
<i>Neurospora crassa</i>	DE GROOT et al. (1998)
<i>Trichoderma reesei</i>	DE GROOT et al. (1998)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BUNDOCK et al. (1999)
<i>Agaricus bisporus</i>	CHEN et al. (2000); MIKOSCH et al. (2001); DE GROOT et al. (1998)
<i>Coccidioides immitis</i>	ABUODEH et al. (2000)
<i>Calonectria morgani</i>	MALONEK & MEINHARDT (2001)
<i>Fusarium circinatum</i>	COVERT et al. (2001)
<i>Fusarium oxysporum</i>	MULLINS et al. (2001)
<i>Magnaporthe grisea</i>	RHO et al. (2001)
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	ZWIERS & WAARD (2001)
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	SULLIVAN et al. (2002)
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	PARDO et al. (2002); COMBIER et al. (2003)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	SULLIVAN et al. (2002)
<i>Paxillus involutus</i>	PARDO et al. (2002)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	SUN et al. (2002)
<i>Suillus bovinus</i>	HANIF et al. (2002); PARDO et al. (2002)
<i>Verticillium fungicola</i>	AMEY et al. (2002)
<i>Aspergillus giganteus</i>	MEYER et al. (2003)
<i>Botrytis cinerea</i>	ROLLAND et al. (2003)
<i>Colletotricum lagenarium</i>	TSUJI et al. (2003)
<i>Helminthosporium turcicum</i>	DEGEFU & HANIF (2003)
<i>Monascus purpureus</i>	CAMPOY et al. (2003)
<i>Mucor miehei</i>	MONFORT et al. (2003)
<i>Phytophthora infestans</i>	VIJN & GOVERS (2003)
<i>Venturia inaequalis</i>	FITZGERALD et al. (2003)
<i>Beauveria bassiana</i>	FANG et al. (2004); LECLERQUE et al. (2004); REIS et al. (2004)
<i>Ceratocystis resinifera</i>	LOPPNAU et al. (2004)
<i>Colletotricum trifolii</i>	TAKAHARA et al. (2004)
<i>Coniothyrium minitans</i>	ROGERS et al. (2004)
<i>Hypholoma sublatentium</i>	GODIO et al. (2004)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	GARDINER & HOWLET (2004)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	LEAL et al. (2004)
<i>Rhizopus oryzae</i>	MICHIELSE et al. (2004c)
<i>Trichoderma atroviride</i>	ZEILINGER (2004)
<i>Verticillium daliae</i>	DOBINSON et al. (2004)

A metodologia para fungos consiste em co-cultivar células alvo do hospedeiro e células de *A. tumefaciens* (contendo o vetor binário). O cultivo é realizado em meio de cultura contendo acetoseringona, a fim de simular o ambiente vegetal e induzir a expressão dos genes *vir*. Após este período (co-cultivo), as células são transferidas para meio seletivo, que contém antibiótico para inibir o desenvolvimento da bactéria além de selecionar células transformadas (DE GROOT et al., 1998).

O sistema *Agrobacterium* exibe uma série de vantagens como método para transformação de fungos, incluindo: (I) alta eficiência de transformação, (II) versatilidade quanto ao tipo de célula alvo, (III) baixo número de cópias do T-DNA no genoma hospedeiro, e (IV) simplicidade metodológica.

O número de marcadores de seleção para a transformação de fungos via *Agrobacterium* ainda é relativamente restrito, sendo o gene *hph* de *E. coli* (resistência a higromicina-B) o marcador mais utilizado. Entre os marcadores mais raramente utilizados encontram-se os genes *ura3*, *pyrG* (CTP sintetase), *npt* (gene de resistência a geneticina) e *Shble* (resistência a fleomicina) (MICHIELSE et al., 2004b).

Quando comparada ao protoplasto-PEG, a transformação via *Agrobacterium* gerou um maior número de transformantes, mesmo quando empregadas condições otimizadas do sistema protoplasto-PEG (AMEY et al., 2002; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; MEYER et al., 2003; LOPPNAU et al., 2004; MICHIELSE et al., 2005). Uma possível explicação é o baixo rendimento na produção e regeneração dos protoplastos, assim como a instabilidade do DNA exógeno (FITZGERALD et al., 2003; MEYER et al., 2003). As eficiências de transformação via *Agrobacterium* também foram superiores quando comparadas ao emprego de REMI

(ROGERS et al., 2004), eletroporação (BUNDOCK et al., 1999; MEYER et al., 2003; LOPPNAU et al., 2004) e biobalística (MEYER et al., 2003; LOPPNAU et al., 2004).

A transformação mediada por *Agrobacterium* tornou-se também uma ferramenta de mutagênese insercional em leveduras e fungos filamentosos (MULLINS & KANG, 2001). Esta estratégia baseia-se na propriedade natural do T-DNA de integrar-se, na maioria das vezes, como cópia única e em sítios aleatórios do genoma hospedeiro. Transformantes com cópia única facilitam a identificação de seqüências de DNA genômico que flanqueiam o T-DNA. O uso da transformação via *Agrobacterium*, associada a técnicas moleculares como “TAIL-PCR” (“Thermal Asymmetrical Interlaced-Polymerase Chain Reaction”), já foi aplicado com sucesso no estudo de mutantes insercionais para algumas espécies fúngicas (COMBIER et al., 2003; ROLLAND et al., 2003; TSUJI et al. 2003).

A mutagênese dirigida a genes específicos também pode ser desenvolvida através da transformação via *Agrobacterium*. Quando seqüências do T-DNA apresentam homologia (total ou parcial) com seqüências do genoma hospedeiro, a integração pode ocorrer por recombinação homóloga. A aplicação da agro-transformação para gerar mutantes por conversão gênica (“inativação gênica”) foi demonstrado pela primeira vez em *A. awamori* com o gene *pyrG*. Vários vetores binários contendo genes ou seqüências homólogas ao genoma hospedeiro foram utilizados com o objetivo de inativação gênica (BUNDOCK et al. 1999; GOUKA et al., 1999; VAN ATTIKUM et al. 2001; ZWIERS & WAARD, 2001; DOBINSON et al. 2004; GARDINER et al. 2004; HOFFMAN & BREUIL, 2004; LOPPNAU et al. 2004; MICHIELSE et al. 2004b; ZEILINGER, 2004).

2.4.3.1 Variáveis do sistema *Agrobacterium* na transformação de fungos

Independente do objetivo, o sucesso da aplicação do sistema *Agrobacterium* na transformação de fungos pode ser atingido através do uso adequado de variáveis inerentes à metodologia. Embora os processos envolvidos na transferência do T-DNA para fungos ainda seja desconhecido, algumas variáveis metodológicas já foram estudadas. A alteração de algumas variáveis pode influenciar a eficiência do sistema para a obtenção de um maior número de transformantes, integração do T-DNA em sítios aleatórios ou específicos e maior probabilidade de integração em cópia única ou múltipla. As variáveis mais estudadas são o tipo de célula alvo (protoplastos, conídios, micélio, e outros), linhagem de *A. tumefaciens*, tempo e temperatura de co-cultivo, razão entre células doadoras e receptoras, pré-tratamento das células de *A. tumefaciens* com acetoseringona e, por fim, a estrutura do vetor binário.

A variedade de tipos celulares que *A. tumefaciens* pode transformar é tido como uma das principais vantagens sobre outras metodologias de transformação. Células como leveduras, protoplastos, conídios, conídios germinados, basidiósporos, micélio e fragmentos do corpo de frutificação já foram transformados com esta metodologia. A agro-transformação de protoplastos e conídios da mesma espécie foi comparada e resultou em eficiências equivalentes, fato que realça ainda mais a não necessidade de obtenção de protoplastos (DE GROOT et al., 1998; ZWIERS & WAARD, 2001). Entretanto, o número de transformantes obtidos via agro-transformação pode variar quando empregado diferentes tipos células alvo. Para espécies como o basidiomiceto *A. bisporus*, por exemplo, o número de transformantes obtidos foi aumentado 7 vezes quando as células alvo foram substituídas de basidiósporos por

tecido do corpo de frutificação (CHEN et al., 2000). Para algumas espécies, como *Coniothyrium minitans*, a agro-transformação só foi possível quando utilizados conídios germinados como células receptoras (ROGERS et al., 2004).

A virulência de determinadas linhagens de *A. tumefaciens* pode ser um fator determinante para a obtenção de um maior número de células transformadas. As diferenças de virulência entre as linhagens bacterianas estão relacionadas tanto a genes cromossomais quanto ao tipo de plasmídeo Ti desarmado. Em geral, a linhagem AGL-1 (C58) tem sido relatada como a mais virulenta para fungos filamentosos, gerando mais transformantes que GV3850, LBA1126 e LBA1100 (CHEN et al., 2000; CAMPOY et al., 2003; ROGERS et al., 2004). Em basidiomicetos, AGL-1 e EHA105 exibiram virulência equivalentes (CHEN et al., 2000).

A alteração de fatores físicos no co-cultivo, como o tempo e temperatura, também tem revelado variação na eficiência da transformação. Para a maioria das espécies fúngicas o co-cultivo por 48 horas tem resultado em uma melhor eficiência de transformação (MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; LEAL et al., 2004). Entretanto, a extensão do tempo de co-cultivo pode resultar em um maior número de transformantes, como observado para a espécie *Hebeloma cylindrosporium* (COMBIER et al., 2003). O período de co-cultivo para algumas espécies tem sido mais restrito, a exemplo de *Aspergillus giganteus*, cuja transformação ocorreu apenas em 48 horas (MEYER et al., 2003). O efeito da temperatura no co-cultivo foi estudado para poucas espécies, sendo que a temperatura ótima de transformação variou entre 22 e 23°C (ROLLAND et al., 2003; COMBIER et al., 2003; GARDINER et al., 2004).

A interação entre *A. tumefaciens* e células hospedeiras é um fator determinante na eficiência de transformação. Esta interação depende, a princípio, da

razão bactéria:fungo durante o co-cultivo. Normalmente, aumentando o número de células fúngicas obtém-se um maior número de transformantes (ZWIERS & WAARD, 2001; ROLLAND et al., 2003; REIS et al., 2004; ROGERS et al., 2004; ZEILINGER, S. 2004). Entretanto, este maior número de transformantes não corresponde ao aumento proporcional de células alvo, indicando uma relação não-direta entre estes dois parâmetros (COVERT et al., 2001; REIS et al., 2004). O aumento no número de bactérias também tem gerado maior eficiência na transformação (ABUODEH et al., 2000; MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; LECLERQUE et al., 2003; MEYER et al., 2003). Em contrapartida, para algumas espécies fúngicas, determinadas concentrações de *A. tumefaciens* não aumentaram o número de transformantes, revelando uma saturação do sistema (COMBIER et al., 2003; FANG et al., 2004; GODIO et al., 2004).

A indução dos genes *vir*, pela presença de acetoseringona durante o co-cultivo, é um fator necessário para a agro-transformação (DE GROOT et al., 1998). O pré-tratamento das células de *A. tumefaciens* com acetoseringona antes do co-cultivo é uma estratégia utilizada para garantir a expressão dos genes *vir* antes da transformação. Embora o acetoseringona seja necessário durante o co-cultivo, o pré-tratamento das células com este composto não é um requisito. Apesar disso, foram observadas diferenças na eficiência de transformação e no número de integrações do T-DNA se as células de *A. tumefaciens* sofreram o pré-tratamento. Na maioria dos casos, o pré-tratamento com acetoseringona gerou um maior número de transformantes (DEGEFU & HANIF, 2003; LECLERQUE et al., 2003), e a análise molecular revelou maior proporção de transformantes com múltiplas integrações (MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001). Um resultado controverso foi observado na agro-transformação de *Hebeloma cylindrosporum*, onde o pré-tratamento com acetoseringona gerou menos

transformantes e com maior proporção de integrações únicas do T-DNA (COMBIER et al., 2003).

A estrutura do vetor binário, em termos de tamanho, tipo de promotor e homologia da seqüência do T-DNA, também pode influenciar na eficiência de transformação. O uso de promotores homólogos, ou de suposta homologia filogenética, para a expressão do gene marcador gerou maior número de transformantes (CHEN et al., 2000; CAMPOY et al., 2003; GODIO et al., 2004).

2.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

Para *M. anisopliae* var. *anisopliae* já foram descritos três métodos de transformação: protoplasto-PEG (BERNIER et al., 1989; GOETTEL et al., 1990; BOGO et al., 1996), eletroporação (ST. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996) e biobalística (ST. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996).

Em geral, nas transformações utilizando o sistema protoplasto-PEG, as freqüências de transformação obtidas pelos autores foram baixas. Bernier e colaboradores (1989) conseguiram apenas 0,08 transformantes/ μ g de DNA, enquanto Goettel e colaboradores (1990) obtiveram 9 transformantes por 50 μ g de DNA para cada $2 \cdot 10^6$ protoplastos viáveis. Bogo e colaboradores (1996) descreveram de 0,8 a 6,9 transformantes/ μ g de DNA.

Utilizando a eletroporação e a biobalística, Bogo e colaboradores (1996) obtiveram uma maior freqüência de transformação quando comparado ao sistema protoplasto-PEG. As freqüências de transformação variaram de 1,3 a 1,8

transformantes/ μg de DNA através da eletroporação, e de 32 a 201 transformantes/ μg de DNA com a biobalística.

Valadares-Inglis e Inglis (1997) relataram a transformação genética de *M. anisopliae* var. *acridum* (CG423) (= *M. flavoviride*) através do método de protoplasto-PEG e utilizando a resistência ao fungicida benomil como marca seletiva. Estes autores obtiveram 15,2 a 84,4 transformantes/ μg de DNA. Posteriormente, Furlaneto e colaboradores (1999) transformaram este mesmo isolado de *M. anisopliae* var. *acridum* e obtiveram transformantes estáveis com alto nível de resistência ao fungicida benomil (até 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), embora a frequência de transformação tenha sido menor que a descrita anteriormente (2,1 a 3,6 transformantes/ μg de DNA).

O isolado CG423 foi recentemente co-transformado com o gene que confere resistência ao glifosinato de amônio (*bar*) e o gene da proteína verde fluorescente (*egfp*), através da metodologia de biobalística (INGLIS et al., 2000). As frequências de transformação foram comparáveis às obtidas para este isolado através de protoplasto-PEG (4 a 88 co-transformantes/ μg de DNA). Entretanto, esta eficiência de transformação foi maior quando comparada ao uso da biobalística em *M. anisopliae* (5 transformantes/ μg de DNA) (ST. LEGER et al., 1995).

A aplicação das técnicas de transformação genética pode ser útil no desenvolvimento de um bioinseticida. Por exemplo, a incorporação de genes de resistência ou genes repórteres em agentes de controle microbiano pode auxiliar nos estudos de triagem em campo, facilitando a distinção entre microrganismos aplicados e as populações endógenas, permitindo desta forma, estudos acerca de sua persistência e efetividade no campo. Além disso, essas técnicas representam uma ferramenta no estudo da expressão de genes de interesse, propiciando a obtenção de linhagens

geneticamente modificadas com melhor efetividade no controle biológico (BARRETO et al. 1997).

Através da introdução de genes relacionados à virulência, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou eficiência melhorada contra *Manduca sexta* (ST. LEGER et al., 1996c). Estes autores inseriram várias cópias do gene homólogo *pr1*, sob controle da seqüência promotora do gene *gpd* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e seqüência de término de transcrição *trpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*. Os transformantes foram capazes de reduzir em 25% o tempo de morte do inseto, além de reduzir o consumo de alimentos, ao redor de 40%, quando comparado à linhagem selvagem. Por outro lado, quando transformantes de *M. anisopliae* contendo múltiplas cópias do gene *chit1* (quitinase de *M. anisopliae* var. *acridum*) foram testados quanto à virulência sobre *M. sexta*, não foi observado efeito significativo no tempo de morte do inseto (SCREEN et al., 2001). A caracterização das proteases e quitinases de *M. anisopliae*, tanto ao nível gênico quanto molecular, é de notável importância para a compreensão da relevância que apresentam sobre a entomopatogenicidade.

Metodologias de transformação genética que possibilitam a obtenção de um banco de mutantes insercionais, como a agro-transformação, representam uma ferramenta adicional para o isolamento e a caracterização de genes relacionados a fatores de virulência, tais como esporulação, produção e regulação de enzimas degradadoras de cutícula, formação de apressório e produção de toxinas. Entretanto, até o momento, não existem relatos do emprego da agro-transformação em *M. anisopliae*.

REFERÊNCIAS

- ABU-ARISH, A.; FRENKIEL-KRISPIN, D.; FRICKE, T.; TZFIRA, T.; CITOVSKY, V.; WOLF, S. G.; ELBAUM, M. Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25359-25363, 2004.
- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGIANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2106-2110, 2000.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed Piracicaba: Ed. da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1998.
- AMEY, R. C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, v. 106, p. 4-11, 2002.
- ARMELO, D.; YE, G.; KLEIN, T. M.; SHARK, K. B.; STANFORD, J. C.; JOHNSTON, S. A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v. 17, p. 97-103, 1990.
- AUSTIN, B.; HALL, R. M.; TYLER, B. M. Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. **Gene**, v. 93, p. 157-162, 1990.
- AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúma, SP, EMBRAPA Meio Ambiente, v. 1, 1998.
- BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; ST. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159-169, 2004.
- BALANCE, D. J.; TURNER, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 36, p. 321-331, 1985.
- BARATTO, U. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 723-726, 2003.
- BARRETO, C. C.; ALVES, L. C.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E.; SCHRANK, A.; VAINSTAIN, M. H. High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, p. 95-99, 1997.

BARRIENTOS, L. L. The present state of the locusts and grasshopper problem in Brazil. **Journal of Orthoptera Research**, v.4, p. 61-64, 1995.

BERNIER, L.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. CLARKSON, J. M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 60, p. 261-266, 1989.

BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.

BOGO, M. R.; VAINSTEIN, M. H.; ARAGAO, F. J.; RECH, E.; SCHRANK, A. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 142, p. 123-127, 1996.

BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO, H.; CAMPOS, M. O.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**, v. 37, p. 221-225, 1998.

BUNDOCK, P.; DEN DULK RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 15272-15275, 1996.

BUNDOCK, P.; MRÓCZEK, K.; WINKLER, A. A.; STEENSMA, H.Y.; HOOYKAAS, P. J. J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 115-121, 1999.

BUNDOCK, P.; VAN ATTIKUM, H. A.; DULK-RAS, A.; HOOYKAAS, P. J. Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Yeast**, v. 19, p. 529-536, 2002.

BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungi as biocontrol agents, **CABI Publishing**, Wallingford, Oxford, 2001.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, v. 43, p. 447-452, 2003.

CANTONE, F. A.; VANDERBERG, J. D. Genetic transformation and mutagenesis of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 281-288, 1999.

CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R.; GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5259-5263, 1979.

CHAKRABORTY, B. N.; PATTERSON, N. A.; KAPOOR, M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 858-863, 1991.

CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G. T.; HOCH, M. C. **The fungal spore and disease initiation in Plants and Animals**. Plenum, New York, p.267-286, 1991.

CHAURE, P.; GURR, S. J.; SPANU, P. Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 205-207, 2000.

CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C.; ROMAINE, C. P. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4510-4513, 2000.

CITOVSKY, V.; GURALNICK, B.; SIMON, M. N.; WALL, J. S. The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single-stranded DNA complexes involved in nuclear import. **Journal of Molecular Biology** v. 271, p. 718-727, 1997.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 197-203, 1996.

CLARKSON; J. M.; SCREEN, S.; BAILEY, A.; COBB, B.; CHARNLEY, K. Fungal pathogenesis in insects. In: **Molecular variability of fungal pathogens**. CAB International, 1998.

COLE, S. C. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 113, p. 189-196, 1993.

COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 141-148, 2003.

CONSENZA, G. W.; CURTI, J. B.; PARO, H. Comportamento e controle do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) no Mato Grosso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p. 173-180, 1989.

CONSENZA, G. W.; RIBEIRO, J. G. B.; CARVALHO, J. S. **Programa Nacional de controle de Gafanhotos. Manual Técnico**. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. EMBRAPA-SPI, 34p. Brasília, DF, 1994.

COOLEY, R. N.; CATEN, C. E. Molecular analysis of the *Septoria nodorum* beta-tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular and General Genetics**, v. 237, p. 58-64, 1993.

CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C.; VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 189-191, 1998.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.

CURTI, J. B.; BRITTO, J. S. National Program of locust control. **Ministério da Agricultura/SDSV**, Brasília. 14 pp, 1987.

DE GROOT, M. J.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J.; BEIJERSBERGEN, A. G.; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839–842, 1998.

DEGEFU, Y.; HANIF, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 279-284, 2003.

D'ENFERT, C. Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. **Current Genetics**, v. 30, p. 76-82, 1996.

DESTÉFANO, R. H. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; MESSIAS, C. L. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 245-252, 2004.

DOBINSON, K. F.; GRANT, S. J.; KANG, S. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. **Current Genetics**, v. 45, p. 104-110, 2004.

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, 2000.

DROCOURT, D.; CAMELS, T.; REYNES, J. P.; BARON, M.; TIRABY, G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hidustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 4009, 1990.

EMBRAPA. **Meio ambiente e gafanhotos pragas no Brasil**. 1997. Acesso: <http://www.nma.embrapa.br/projetos/gafa-mt/ind.html>

EMBRAPA. **Relatório final do projeto Meio ambiente e gafanhotos-pragas no Brasil**. 1996. Acesso: <http://www.gafanhotos.cnpm.embrapa.br>

FANG, W.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; DUAN, H.; LI, Y.; PEI, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 18-24, 2004.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 22, p. 18-21, 2001.

FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEV, S.; POPEYE, R.; ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACR.) sien champignon hyphomycète entomopathogène. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances Del' Academie dès Sciences**, v. 281, p.1781-1784, 1975.

FILHO, E. C.; MARQUES, E. J.; BARROS, R. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 457-462, 2002.

FINCHAM, J. R. Transformation in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 148-170, 1989.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, v. 107, p. 803-810, 2003.

FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insects hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.

FULLNER, K. J.; LARA, C. J.; NESTER, E. W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. **Science**, v. 273, p. 1107-1109, 1996.

FUNGARO, M. H. P.; RECH, E.; MUHLEN, G. S.; VAINSTEN, M. H.; PASCON, R. C.; QUEIROZ, M. V.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, p. 293-298, 1995.

FUNGARO, M. H. P.; POLI, R. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; BEJIN, E.; LEJEUNE, B.; AZEVEDO, J. L. Genetic and molecular analysis of *Aspergillus nidulans* transformants obtained by biolistic process. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 718-722, 1997.

FURLANETO, M. C.; PAIÃO, F. G.; PINTO, F. G. S.; FUNGARO, M. H. P. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 875-878, 1999.

GAD, A. E.; ROSENBERG, N.; ALTMAN, A. Liposome-mediated gene delivery into plant cells. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 177-183, 1990.

GARDINER, D. M.; HOWLET, B. J. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, v. 45, p. 249-255, 2004.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "Gene-Jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-37, 2003.

GHAI, J.; DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium* Ti plasmid encodes a DNA relaxing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 3109-3113, 1989.

GHEYSEN, G.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. **Genes & Development**, v. 5, p. 287-297, 1991.

GILLESPIE, J. P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A. K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 128-137, 1998.

GODIO, R. P.; FOUCES, R.; GUDIÑA, E. J.; MARTÍN, J. F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavaric acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. **Current Genetics**, v. 46, p. 287-294, 2004.

GOETTEL, M. S.; LEGER, R. J. S.; BHAIRI, S.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R.; ROBERTS, D. W. e STAPLES, R. C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisoplae* stably transformed to benomyl resistance. **Current Genetics**, v. 17, p. 129-132, 1990.

GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L.; INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, s71-s75 (suppl.1), 1995.

GOLDMAN, G. H.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage pulse. **Current Genetics**, v. 226, p. 169-174, 1990.

GOLDMAN, G. H.; TEMMERMAN, W.; JACOBS, D.; CONTRERAS, R.; MONTAGU, M. V.; HERRERA-ESTRELLA, A. A point mutation in one of the beta-tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimetabolic drug methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate. **Molecular and General Genetics**, v. 240, p. 73-80, 1993.

GOUKA, R. J.; GERK, C.; HOOYKAAS, P. J. J.; BUNDOCK, P.; MUSTERS, W.; VERRIPS, C. T.; DE GROOT, M. J. A. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 598-601, 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss Inc., 2ª Edição, Nova Iorque, EUA, 458p, 1994.

GRITZ, L.; DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 25, p. 179-188, 1983.

HAMILTON, C. M.; FRARY, A.; LEWIS, C.; TANKSLEY, S. D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 9975–9979, 1996.

HANIF, M.; PARDO, A. G.; GORFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. **Current Genetics**, v. 41, p. 183-188, 2002.

HAWES, M. C.; SMITH, L. Y.; HOWARTH, A. J. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudates. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 1, p. 182-186, 1988.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, v. 303, p. 209-213, 1983.

HILBER, U. W.; BODMER, M. SMITH, F. D.; KOLLER, W. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. **Current Genetics**, v. 25, p. 124-127, 1994.

HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast chimeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 1929-1933, 1978.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROOT, R. A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-179, 1994.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents**. Wallingford, CAB International, p. 23-69, 2001.

INGLIS, P. W.; ARAGÃO, F. J. L.; FRAZÃO, H.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES-INGLIS, M. C. Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, p. 249-254, 2000.

JOHN, M. A.; PEBERDY, J. F. Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 386, 1984.
58

JOSHI, L.; ST. LEGER, R. J. Cloning, expression and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxipeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 9803-9811, 1999.

JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R. Identification of an amino acid substitution in the *benA*, beta-tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 17, p. 87-94, 1990.

JUNG, M. K.; WILDER, I. B.; OAKLEY, B. R. Amino acid alterations in the *benA* (beta-tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 22, p. 170-174, 1992.

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 276-281, 1999.

KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 213-223, 1999.

KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 446-451, 2000.

KOENRAADT, H.; SOMMERVILLE, S. C.; JONES, A. L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 82, p. 1348-1353, 1992.

LANGEWALD, J.; OUAMBAMA, Z.; MAMADOU, A.; PEVELING, R.; STOLZ, I.; BATEMAN, R.; ATTIGNON, S.; BLANFORD, S.; ARTHURS, S.; LOMER, C. Comparison of an organophosphate insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* Krauss (Orthoptera: Acrididae) and other Sahelian grasshoppers in the field at operational scale. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 199-214, 1999.

LEAL C. V.; MONTES B. A.; MESA A. C.; RUA A. L.; CORREDOR M.; RESTREPO A., MCEWEN J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 42, p. 391-395, 2004.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHÜTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G. V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H. U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, v. 45, p. 111-119, 2004.

LEE, K. Y.; LUND, P.; LOWE, K.; DUNSMUIR, P. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell**, v. 2, p. 415-425, 1990.

LIPP-NISSINEN, K. H. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 104-111, 1993.

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 178-182, 2001.

LOMER, C. J., BATEMAN, R. P., JOHNSON, D. L., LANGEWALD, J., THOMAS, M. B. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p.667-702, 2001.

LOPER, J. E.; KADO, C. I. Host range conferred by the virulence specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 139, p. 591-596, 1979.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; TAMAI, M. A. Fungo *Metarhizium anisopliae* e o controle de *Frankliniella accidentalis* em alface hidropônico. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 239-243, 2000.

LOPPNAU, P.; TANGUAY, P.; BREUIL, C. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 33-41, 2004.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p.35-40, 2004.

LUNA, E. A.; AZEVEDO, J. L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, v.37, p.721, 1985.

LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, 839-346, 1998.

MAGALHÃES, B. P.; FARIA, M. R.; LECOQ, M.; SCHMIDT, F. G. V.; SILVA, J. B. T.; FRAZÃO, H. S.; BALANÇA, G.; FOUCART, A. The use of *Metarhizium anisopliae* var.

acridum against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. **Journal of Orthoptera Research**, v. 10, p. 199-202, 2001.

MAGALHÃES, B. P.; VICENTINI, S. Infection of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* by the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, v. 25, p. 309-314, 1997.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**, v. 40, p. 152-155, 2001.

MARQUES, E. J.; VILAS-BOAS, A. M. Contribuição ao estudo da cultura da aplicação de *Metarhizium anisopliae* no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata*) no Nordeste do Brasil. **Anais I Reunião Anial da Sociedade de Entomologia do Brasil**, Viçosa, MG, p. 70, 1978.

MARTINS, M. K.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Double-strand RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, v. 36, p. 94-97, 1999.

MATTHYSSE, A. G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 906-915, 1983.

MATTHYSSE, A. G.; KIJNE, J. W. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: SPAINK, H. P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P. J. J. **The Rhizobiaceae**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 235-249, 1998.

MATTHYSSE, A. G.; YARNALL, H.; BOLES, S. B.; MCMAHAN, S. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1490, p. 208-212, 2000.

McCOY, C. W.; MILANI-TIGANO, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 87-93, 1996.

MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 57-59, 1989.

MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of British Mycological Society**, v. 75, p. 473-477, 1980.

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, v. 43, p. 371-377, 2003.

MICHIELSE, C. B.; ARENTSHORST, M.; RAM, A. F. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improve gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 9-19, 2005.

MICHIELSE, C. B.; RAM, A. F. J.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 571-578, 2004a.

MICHIELSE, C. B.; RAM, A. F. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. T. The *Aspergillus nidulans amdS* gene as a marker for the identification of multicopy T-DNA integration events in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. **Current Genetics**, v. 45, p. 399-403, 2004b.

MICHIELSE, C. B.; SALIM, K.; RAGAS, P.; RAM, A. F. J.; KUDLA, B.; JARRY, B.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Molecular Gen Genomics**, v. 271, p. 499-510, 2004c.

MIKOSCH, T. S. P.; LAVRIJSSSEN, B.; SONNENBERG, A. S. M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, v. 39, p. 35-39, 2001.

MOREIRA, M. A.; MAGALHÃES, B. P., VALADARES, M. C. C.; CHAGAS, M. C. M. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* on *Schistocerca pallens* in Rio Grande do Norte, Brazil. **Anais de Sociedade Brasileira de Entomologia**, v. 25, p. 359-361, 1996.

MONFORT, A.; CORDERO, L.; MAICAS, S.; POLAINA, J. Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 101-106, 2003.

MORAES, C. K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 46, p. 205-210, 2003.

MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 2043-5052, 2001.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.

MYSORE, K. S.; NAM, J.; GELVIN, S. B. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 948-953, 2000.

NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 80-88, 2004.

NAIR, G. R.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. **Plant Physiology**, v. 133, p. 989-999, 2003.

NAM, J.; MATTHYSSE, A. G.; GELVIN, S. B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v. 9, p. 317-333, 1997.

NOWIERSKI, R. M.; ZENG, Z.; JARONSKI, S.; DELGADO, F.; SWEARINGEN, W. Analysis and modeling of time-dose mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium* and *Paecilomyces* isolates from Madagascar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 236-252, 1996.

OAKLEY, B. R.; RINEHART, J. E.; MITCHELL, B. L.; OAKLEY, C. E.; CARMONA, C.; GRAY, G.; MAY, G. S. Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 61, p. 385-3999, 1987.

ONOFRE, S. B.; VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; BARROS, N. M.; BOLDO, J. T.; NUNES, A. R. F.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, EDUCS, Caxias do Sul, p. 295-317, 2002.

ORBACH, M. J.; PORRO, E. B.; YANOFSKY, C. Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, p. 2452-2461, 1986.

PARDO, A. G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Mycological Research**, v. 106, p. 132-137, 2002.

PARRA, J. R. P. Controlando pragas com inimigos naturais. **Ciencia Hoje**, v. 35, n. 210, p. 18-23, 2004.

PATERSON, I. C.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M.; CLARKSON, M. Specific induction of a cuticle-degrading protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 185-189, 1994a.

PATERSON, I. C.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M.; CLARKSON, M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 3153-3159, 1994b.

PAULSSON, M.; WADSTROM, T. Vitronectin and type-I collagen binding by *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 55-62, 1990.

PEBERDY, J. F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 33, p. 21-39, 1979.

PEVELING, R.; ATTIGNON, S.; LANGEWALD, J.; OUAMBAMA, Z. An assessment of the impact of biological and chemical grasshopper control agents on ground-dwelling arthropods in Niger, based on presence/absence sampling. **Crop Protection**, v. 18, p. 323-339, 1999.

PFEIFER, T. A., KHACHATOURIANS, G. G., *Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 376-381, 1992.

PIERS, K. L.; HEALTH, J. D.; LIANG, X.; STEPHENS, K. M.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 1613-1618, 1996.

PINTO, F. G. S. **Detecção e caracterização de proteases extracelulares do fungo entomopatogênico *Metarhizium flavoviride***. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 1999.

PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. J.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of extracellular chitinase from entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 322-327, 1997.

PINTO, F. G. S.; FUNGARO, M. H. P.; FERREIRA, J. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FURLANETO, M. C. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 231-234, 2002.

QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIRÓS, R.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 51-58, 2004.

REIS, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 197–202, 2004.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, v. 12, p. 407-411, 2001.

RICHEY, M. G.; MAREK, E. T.; SCHARDL, C. L.; SMITH, D. A. Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. **Phytopathology**, v. 9, p. 844-847, 1989.

ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P.; GREEN, J. R.; WHIPPS, J. M. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 207-214, 2004.

ROLLAND, S.; JOBIE, C.; FEVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, v. 44, p. 164-171, 2003.

RUIZ-DÍEZ, B. A review: Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 189-195, 2002.

SAMUELS, K. D. Z.; PINNOCK, D. E.; ALLSOPP, P. G. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) as a biological control-agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 28, p. 69-74, 1989.

SAMUELS, R. I.; PEREIRA, R. C.; GAVA, C. A. T. Infection of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, p. 631-635, 2002.

SANDHU, S.S.; RAJAK, R.C.; SHARMA, M. Bioactivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as pathogens of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes aegypti*: effect of instar, dosages and time. **Indian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 191-194, 1993.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHOLTE, E.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria Journal**, v. 2, p. 29, 2003.

SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 260-266, 2001.

SEIP, E. R.; WOLOSHUK, C. P.; PAYNE, G. A.; CURTIS, S. E. Isolation and sequence analysis of a beta-tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3686-3692, 1990.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 413-423, 2003.

SHAW, C. H.; ASHBY, A. M.; BROWN, A.; ROYAL, C.; LOAKE, G. J.; SHAW, C. *virA* and *virG* are Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 413-417, 1988.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.

SCHIESTL, R. H.; PETES, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 7585-7589, 1991.

SHOWLER, A. T. The Desert Locust in Africa and Western Asia: Complexities of War, Politics, Perilous Terrain, and Development. In: **RADCLIFFE, E. B.; HUTCHISON, W. D. Radcliffe's IPM World Textbook**. University of Minnesota, St. Paul, MN. 1996. Acesso: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/showler.htm>

SMITH, H. O.; DANNER, D. B. Genetic transformation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 37, p. 41-43, 1981.

SOSA-GOMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 115-120, 1998.

SOUZA, C. C.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Tagging of genes involved in multidrug resistance in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v. 263, p. 702-711, 2000.

SOWERS, K. R.; SCHREIER, H. J. Gene transfer systems for the Archaea. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 212-219, 1999.

ST. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 221-232, 1987.

ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 285-293, 1988a.

ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 413-416, 1988b.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 253-262, 1989.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 415-426, 1991a.

ST. LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991b.

ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, p. 1-7, 1994.

ST. LEGER, R. J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using gene-gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 289-294, 1995.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 907-912, 1996a.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1257-1264, 1996b.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, W. D. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6349-6354, 1996c.

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, p. 709-713, 1998.

SULLIVAN, T. D.; ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 895-905, 2002.

SUN, L.; CAI, H.; XU, W.; HU, Y.; GAI, Y.; LIN, Z. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 383a-383j, 2001.

SUN, C. B.; KONG, Q. L.; XU, W. S. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 21-28, 2002.

SUNAGAWA, M.; MAGAE, Y. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, p. 143-146, 2002.

TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KABO, Y.; YAMAMOTO, M.; TOYODA, K.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y.; SHIRAISHI, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for a random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of Plant Pathology**, v. 70, p. 93-96, 2004.

THOMASHOW, M. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti plasmid. **Nature**, v. 283, p. 794-796, 1980.

TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSIMA, J. H.; LOCKINGTON, R. A.; DAVIS, R. W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205-221, 1983.

TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 178-184, 1996.

TINLAND, B.; HOHN, B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. **Genetic Engineering**, v. 17, p. 209-229, 1995.

TINLINE, R. D.; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v. 63, p.701-712, 1971.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p. 230-239, 2003.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

ULHOA, C. J.; VAINSTEIN, M. H.; PEBERDY, J. F. Transformation of *Trichoderma* species with dominant selectable markers. **Current Genetics**, v. 21, p. 23-26, 1992.

VAN ATTIKUM, H.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. **THE EMBO Journal**, v. 20, p. 6550-6558, 2001.

VAN ATTIKUM, H.; HOOYKAAS, P. J. Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 826-832, 2003.

VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, p. 199-202, 1997.

VALADARES-INGLIS, M. C.; PEBERDY, J. F. Variation in the electrophoretic karyotype of Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p.11-14, 1998.

VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. In: Peberdy, C. E. **Applied Molecular Genetics of Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, c. 1, p. 1-28, 1990.

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 459-467, 2003.

WADA, M.; BEPPU, T.; HORINOUCI, S. Integrative transformation of the zigomycete *Rhizomucor pusillus* by homologous recombination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 652-657, 1996.

WAGNER, V. T.; MATTHYSSE, A. G. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5999-6003, 1992.

WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Right 25 bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v. 38, p. 455-462, 1984.

WARD, M.; KODAMA, K. H.; WILSON, L. J. The *oliC* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, v. 28, p. 37-42, 1988.

WATTS, J. W.; STACEY, N. J. Novel methods of DNA transfer. In: PEBERDY, J. F.; CATEN, C. E.; OGDEN, J. E.; BENNETT, J. W. **Applied Molecular Genetics of Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA, 1990.

WEISING, K.; KAHL, G. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 327-351, 1996.

WOOD, D. W. et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, p. 2317-2323, 2001.

XAVIER-SANTOS, S.; MAGALHÃES, B.P.; LIMA, E.L.A. Infectivity of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in the laboratory. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 359-363, 1999.

YELTON, M. M.; HAMER, J. E.; TIMBERLAKE, W. E. Transformation of *Aspergillus nidulans* using a *trpC* plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 1470-1474, 1984.

ZAMBRYSKI, P. C.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. S. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v. 2, p. 2143-2150, 1983.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atrovirive* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, v. 45, p. 54-60, 2004.

ZHU, J. K.; DAMSZ, B.; KONONOWICZ, A. K.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. **Plant Cell**, v. 6, p. 393-404, 1994.

ZIEMIENOWICZ, A. Odissey of *Agrobacterium* T-DNA. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 623-635, 2001.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1041-1047, 1995.

ZWIERS, L. H.; WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, v. 39, p. 388-39, 2001.

Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and protease mutants isolation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum

Rubens T. D. Duarte ^a, Ariane C. Donatti ^a, Charley C. Staats ^b, Maria H. P. Fungaro ^a, Augusto Schrank ^b, Celso V. Nakamura ^c, Wanderley de Souza ^d, Marcia C. Furlaneto ^{a,*}

^a Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, 86051-990 Londrina -PR, Brazil

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

^c Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá-PR, Brazil

^d Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55(43)33715736; Fax: +55(43)33714207;

E-mail: mcfurlan@sercomtel.com.br (M. C. Furlaneto).

Abstract

We report that *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 attaches to and genetically transforms the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423. The *Agrobacterium*-mediated transformation was applied using two distinct binary vectors carrying a benomyl resistance (β -tubulin) gene as a selection marker. The efficiency of transformation was up to 53 transformants per 10⁵ target conidia. High mitotic stability of the transformants (89-97%) was demonstrated after five successive transfers on non-selective media. Highly resistant transformants were obtained which showed capacity of growing on increased concentrations of benomyl (up to 100 μ g ml⁻¹). We obtained three putative T-DNA-tagged mutants with altered protease production. Thus, the described protocol could provide an useful tool to tag genes that may be important for pathogenesis and virulence of this fungus.

Keywords: *Agrobacterium* attachment, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, benomyl resistance, protease mutants

1 INTRODUCTION

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* is regarded as one of the most promising species known in the development of practical insect biological control agents of grasshoppers (Prior et al. 1992; Butt et al., 2001). In Brazil, a biocontrol program has been assembled for the purpose of developing a native strain (CG423) of *M. anisopliae* var. *acridum* as a bioinsecticide against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* (Magalhães 1997) which until recently has been a major problem in Central Brazil causing severe agricultural losses.

Entomopathogenic fungi exhibit many attributes, which determine virulence towards their hosts. Proteases are involved in insect cuticle degradation during pathogenesis, assisting penetration and providing nutrients for further growth. Recent studies based on the analysis of expressed sequence tag (EST) revealed the expression of several proteases by *M. anisopliae* var. *acridum* during growth on cockroach cuticle (Freimoser et al. 2003). The production of cuticle-degrading proteases by strain CG423 after growth on grasshopper cuticle has been examined (Pinto et al. 2002; Tiago et al. 2002).

The development of efficient transformation systems for entomopathogenic fungi is essential for testing candidate genes responsible for pathogenicity and virulence making possible target improvements for the purpose of biological control. Gene transfer systems have previously been reported for the strain CG423 using a conventional method (protoplast-PEG) (Valadares-Inglis and Inglis, 1997; Furlaneto et al. 1999) and particle bombardment (Inglis et al. 2000). Transformation efficiencies were low when using the PEG-method (Furlaneto et al.

1999) while the biolistic method has shown to increase the transformant yield considerably (Inglis et al. 2000).

In recent years, fungal transformation has progressed substantially due to the development of a new approach based on the ability of the phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* to transfer DNA to filamentous fungi (De Groot et al. 1998). *A. tumefaciens* is a soil bacterium, which has the ability to transfer part of plasmid borne DNA (T-DNA) to plants. This mechanism requires the presence of the virulence (*vir*) region located on the Ti (tumor-inducing) plasmid which encodes most components of the protein apparatus for T-DNA transfer and several chromosomal virulence genes (*chv*) involved in the early stages of *Agrobacterium* attachment to the plant cells (reviewed in Tzfira and Citovsky, 2000). The *A. tumefaciens*-mediated transformation approach has been shown to be a good alternative to other fungal transformation methods rendering in higher number of transformants (Amey et al. 2002; Campoy et al. 2003; Fitzgerald et al. 2003; Meyer et al. 2003). Furthermore, agro-transformation represents a useful method for insertional mutagenesis studies since it generates a high percentage of transformants with single T-DNA integration at random chromosomal sites in the fungal genome (Mullins et al. 2001; Combier et al. 2003; Tsuji et al. 2003; Leclerque et al. 2004). This transformation method has also been successfully applied for fungal gene replacement (Dobinson et al. 2003; Michielse et al. 2005).

In this paper, we report for the first time the attachment of *Agrobacterium* to fungal host cells and an efficient protocol for the *A. tumefaciens*-mediated transformation of *M. anisopliae* var. *acridum*. Mitotic stability and resistance levels of the transformants were examined. We also evaluated transformants for changes in protease production. This transformation approach would represent an useful tool for insertional mutagenesis studies in *M. anisopliae* var. *acridum*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Strains and plasmids

The *M. anisopliae* var. *acidum* strain CG423 was obtained from the Cenargen/Embrapa collection of entomopathogenic fungi (Cenargen. Brasília/DF - Brazil). *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 was kindly provided by Dr. C. Peter Romaine (Department of Plant Pathology. The Pennsylvania State University, USA). The binary vectors pBINT6 and pCAB3100 were constructed by insertion of a 3.1-Kb *Hind*III fragment from pBT6 (Orbach et al. 1986), between T-DNA border sequences of the backbones pBIN19 (Bevan 1984) and pZP-201BK (Covert et al. 2001), respectively. This fragment contains the structural β -tubulin gene (*bml*) from a benomyl-resistant strain of *Neurospora crassa*.

2.2 Electron microscopic analysis of the co-cultivated pair

Initially, *A. tumefaciens* strain AGL-1 was transformed with the binary vectors by a heat-shock method (Bowyer, 2001). *A. tumefaciens* transformants were isolated on LB agar (Sambrook and Russel 2001) plates supplemented with 50 μ g ml⁻¹ of kanamycin and 50 μ g ml⁻¹ of streptomycin.

The co-cultivation of *A. tumefaciens* and *M. anisopliae* var. *acidum* was analysed under scanning electron microscopy (SEM). An overnight culture of AGL-1 harboring the vector pBINT6 was grown at 28°C in liquid LB medium supplemented with appropriate antibiotics. The mid-log phase culture (OD₆₆₀ = 0,6) was centrifuged at

9000g for 5 min at 4°C and cells resuspended in induction medium (IM) (Reis et al. 2004) to a final concentration of 10⁸ cells mL⁻¹. Fungal conidia were harvested from sporulated cultures grown on agar plates with complete medium (CM) (Pontecorvo et al. 1953) and resuspended in the same liquid medium to a final concentration of 10⁶ conidia mL⁻¹. The co-cultivation was performed by addition of 100 µl of each suspension in 24-wells plate containing 13-mm diameter cover glasses. The mix volume was adjusted to 1 ml by addition of IM medium with or without 200 µM acetoseryngone (AS). After co-cultivation at 28°C for 9 h the cover glasses were washed twice with sterile distilled water followed by 2.5% glutaraldehyde fixation at room temperature for 2 h. Post-fixation was carried out for 30 min at 28°C with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl₂. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO₂, coated with carbon in a Balzers system (MED 010) and viewed in a JEOL-JSM-6340F Field Emission Scanning Electron Microscope. Images were obtained using secondary electrons.

2.3 A. tumefaciens-mediated transformation

Transformation of *M. anisopliae* var. *acidum* was carried out as described by Reis et al. (2004) with modifications. *A. tumefaciens* strain AGL-1 harboring the binary vectors was grown at 28°C for 18 h in liquid LB medium supplemented with appropriate antibiotics. The culture was diluted to OD₆₆₀ of 0.15 in 20 ml of IM medium added of 200 µM AS. The cells were grown under the same

conditions until an OD₆₆₀ of 0.6-0.8 was reached, corresponding to of approximately 108 ml⁻¹. Co-cultivation between *A. tumefaciens* and *M. anisopliae* var. *acridum* was performed by addition of 100 µl of bacterial culture in 100 µl of fungal conidia suspension (1x10⁶ conidia ml⁻¹). This mix was plated on nitro-cellulose filters (0.45 µm pore and 90 mm diameter, MFS-Japan) on a co-cultivation medium (same as IM medium, except containing 5 mM instead of 10 mM glucose) with or without 200 µM AS. Following co-cultivation at 28 °C for 36 h, 5 ml of molten CM agar supplemented with benomyl (13 µg ml⁻¹) and mefoxin (150 µg ml⁻¹) were poured over the plates as an overlay for the selection of fungal transformants and to inhibit growth of *A. tumefaciens* cells, respectively. Each putative transformants was transferred to CM agar added of 13 µg ml⁻¹ of benomyl and plates were incubated as previously.

2.4 Mitotic stability and resistance analysis

Mitotic stability of the integrated T-DNA was assessed by successively culturing of putative transformants on CM agar for five generations in the absence of benomyl, after which transformants were transferred to CM agar added of benomyl (13 µg ml⁻¹). The resistance to benomyl was tested at different concentrations (13, 25, 50 and 100 µg ml⁻¹). Plates were incubated at 28°C for 7 days.

2.5 Protease assay

The putative transformants were initially screened for protease production on agar plates containing minimal medium (MM) (Pontecorvo et al. 1953) lacking nitrogen source and amended with 0.2% (w/v) skimmed milk. Conidia from wild-type CG423 and transformants were point-inoculated onto solid media following incubation at 28°C for 72 h. The plates were flooded with 100% acetic acid. The unprecipitated zone of clearing showed the hydrolysis of milk due to the production of protease. Protease secretion was measured as the ratio of diameters of the zone of clearing plus colony to that of the colony. Protease activity was also determined in culture supernatants from wild-type CG423 and transformants with altered protease secretion by harvesting conidia from sporulated cultures grown on agar plates of MM medium supplemented with 0.5% (w/v) *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle (MM+cut), prepared from adult insects using an aqueous solution of 1 % (w/v) potassium tetraborate. For enzyme production conidia were inoculated into 30 ml of liquid MM+cut medium at 5×10^6 conidia ml⁻¹ and grown in submerged cultures (180 rpm) at 28°C for up to 96 h. Following growth, mycelium was harvested by centrifugation at 8000g for 15 min. The supernatants (extracellular fraction) were assayed for protease activity. Proteolytic activity was quantified using the chromogenic substrate azocasein as described by Tiago et al. (2004). The values represent the mean of three independent experiments performed in duplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A. tumefaciens recognition of and attachment to the host cells is an early and essential step of the infection process. Thus, we examined the ability of *Agrobacterium* strain AGL-1 to attach to *M. anisopliae* var. *acridum* strain CG423 under co-cultivation. As shown in Fig. 1 (A,B) *Agrobacterium* attaches to *Metarhizium* conidia-germ tubes forming bacterial aggregates at and around the host cells, as found in *Agrobacterium*-plant interaction (Matthysse et al 1981). We also observed the occurrence of fibril-like structures connecting neighbouring bacterial-fungal cells (Fig. 1C,D). These structures were observed in both co-cultivations with and without AS, and measured 82 nm (\pm 12 nm) in width. According to Fullner et al (1996) the agrobacteria, whose *vir* genes are induced by acetosyringone, can form surface protein structures which are presumably involved in the transfer of T-DNA to plant cells. Chumakov et al (2001) described microfibrils production by agrobacteria cells of both when in contact with plant cells (wheat seedlings) and when in contact with each other. Currently, close examination of *A. tumefaciens* cells paired with host cells other than plant cells is limited to *Streptomyces lividans* cells (Kelly and Kado, 2002) and human cells (Kunik et al., 2001). The latter authors described that the binding of *Agrobacterium* to human cells requires the same bacterial factors needed for its attachment to plant cells.

We showed the applicability of the agro-transformation method for *M. anisopliae* var. *acridum* using conidia as starting cells and benomyl resistance gene as selective trait. For selection of resistant colonies in transformation experiments, 13.0 μ g ml⁻¹ benomyl (2-fold the minimal inhibitory concentration) was applied as previously described by Furlaneto et al. (1999).

Putative transformants emerged from the selective medium as distinct colonies within 7-10 days incubation, when the co-cultivation was performed in medium added of inducer acetosyringone (AS). The addition of the inducer AS was essential for transformation (Table 1). The plant phenolic AS induces expression of the bacterial *vir* genes (Gelvin, 2000) and as it is not produced by fungi, its addition is essential for successful *Agrobacterium*-mediated fungal transformation (De Groot et al. 1998).

The transformation frequencies achieved for *Metarhizium* strain CG423 using *A. tumefaciens* strain AGL-1, harboring vectors pBINT6 and pCAB3100, are given in Table 1. These frequencies were much higher than previously reported using the protoplast-PEG method (Furlaneto et al. 1999), particularly if the number of target cells (conidia) is considered and comparable to the frequency obtained by particle bombardment (Inglis et al. 2000). Our data demonstrate the advantage of using *Agrobacterium* as a tool in *M. anisoplaie* var. *acridum* transformation, since this method circumvents the time-consuming protoplast isolation and the need of the particle bombardment equipment. The binary plasmid backbone seems to influence the frequency of transformation since the employment of the plasmid pCAB3100 resulted in higher number of transformants compared to that of pBINT6 (Table 1). The small plasmid derived from pPZP201 series, like pCAB3100, possesses a high copy number and the T-DNA is composed only of right and left borders with the gene of interest in the multiple cloning site (Hajdukiewicz et al., 1994). Plasmids from pBIN19 are larger and the replication origin from pRK252 cannot render high copy number. Furthermore, the T-DNA of pBIN19 derived vectors are composed of genes coding for nopaline synthase, neomycin phosphotransferase and the region from M13mp19 cloning vector that allow α complementation screening during cloning steps (Bevan, 1984). This way, the

differences like plasmid copy number and T-DNA composition appears as parameters that influence DNA transfer to *Metarhizium* integration sites.

All putative transformants obtained from each vector were repeatedly transferred to non-selective medium in order to investigate the mitotic stability of the integrated T-DNA. Following five rounds of growth on non-selective medium (without benomyl), clones were transferred to selective medium. High frequencies of mitotic stability were observed (Table 1). These mitotic stabilities compare favorably with those obtained for several filamentous fungi using *Agrobacterium*-mediated transformation (Covert et al. 2001; Rho, et al. 2001; Fitzgerald et al. 2003; Meyer et al. 2003; Reis et al. 2004). The transformants analysed never formed sectors although variation in growth rates and colony morphology were observed (data not shown).

In the present study agro-transformation yielded stable transformants of *M. anisopliae* var. *acridum* capable of growing on increased concentrations of benomyl (up to 100 µg ml⁻¹) (Fig. 2). Highly resistant transformants were also obtained for *Verticillium fungicola* (Amey et al. 2002). Since proteases produced by entomopathogenic fungi are believed to play an important role in cuticle penetration (St Leger 1995), the transformants were screened for altered protease production on agar plates containing skimmed milk as the sole nitrogen source. Eight transformants displayed lower protease secretion than the wild-type CG423 (data not shown). These mutants were tested for protease production after growth in the presence of grasshopper cuticle. Three putative T-DNA-tagged mutants (T11, T15 and T17) had a significantly (Parwise t-Test) lower protease production compared to the wild-type CG423 (Fig. 3).

We now concentrate on the determination of the nature of the transforming T-DNA insertions into the transformants genome and on the recovering of T-DNA flanking sequences from the *M. anisopliae* var. *acridum* mutants by applying a PCR-based technique named thermal asymmetric interlaced (TAIL)-PCR (Liu and Whittier 1995). This approach is the major advantage of *Agrobacterium*-mediated transformation over conventional plasmid transformation methods and has been successfully applied for the identification of melanin biosynthesis genes of *Colletotrichum lagenarium* (Tsuji et al., 2003). Considering the efficiency and flexibility of the agro-transformation protocol, this appears to be a highly efficient tool in characterising virulence genes of *M. anisopliae* var. *acridum*.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and PROPPG/UEL - Brazil. R.T.D.D. is fellowship-holder of CAPES-Brazil. The authors thank Dr. Albert Leyva for reading the manuscript.

REFERENCES

- Amey, R.C., Athey-Pollard, A., Burns, C., Mills, P.R., Bailey, A. and Foster, G.D. (2002) PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycol. Res.* 106,4-11.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.
- Bowyer, P. (2001) DNA-mediated transformation of fungi. In: *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi*. (Talbot, N. Ed.), pp. 33-46. Oxford University Press, Oxford.
- Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. (2001) *Fungi as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, Oxford.
- Campoy, S., Pérez, F., Martín, J.F., Gutierrez, S. and Liras, P. (2003) Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr. Genet.* 43, 447-452.
- Chumakov, M.I., Dykman, L.A., Bogatyrev, V.A. and Kurbanova, I.V. (2001) Investigation of the cell surface structures of *Agrobacteria* involved in bacterial and plant interactions. *Microbiology* 70, 232-238.
- Combiér, J.P., Melayah, D., Raffier, C., Gay, G. and Marmeisse, R. (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 141-148.
- Covert, S.F., Kappor, P., Lee, M., Briley, A. and Nairn, C.J. (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.* 105, 259-264.
- De Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J. and Beijersbergen, A.G.M. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16, 839-842.
- Dobinson, K.F., Grant, S.J. and Kang, S.K. (2004) Cloning and target disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr. Genet.* 45, 104-110.
- Fitzgerald, A.M., Mudge, A.M., Gleave, A.P. and Plummer, K.M. (2003) *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol. Res.* 107,803-810.
- Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G. and St Leger, R.J. (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a

plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* 149, 239-247.

Fullner, K.J., Lara, J.C. and Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273, 1007-1009.

Furlaneto, M.C., Paião, F.G., Pinto, F.G.S. and Fungaro, M.H.P. (1999) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* to high resistance to benomyl. *Can. J. Microbiol.* 45, 875-878.

Gelvin, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 223-256.

Haidukiewicz, P. Svab, Z. and Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol.* 25, 989-994.

Inglis, P.W., Aragão, F.J.L., Frazão, H., Magalhães, B.P. and Valadares-Inglis, M.C. (2000) Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 249-254.

Kelly, B.A. and Kado, C.I. (2002) *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. *Mol. Plant Pathol.* 3, 125-134.

Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1871-1876.

Leclerque, A., Wan, H., Abschutz, A., Chen, S., Mitina, G.V., Zimmermann, G. and Schairer, H.U. (2004) *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr. Genet.* 45, 111-119.

Liu, Y. and Whittier, R.F. (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674-681.

Magalhães, B.P. (1997) Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In: *Progress in Microbial Ecology* (Martins, M.T., Sato, M.I.Z., Tiedje, J.M., Hagler, L.C.N., Dobereiner, J., Sanchez, P.S., Eds.), pp. 429-433. Brazilian Society for microbiology/ICOME, Santos.

Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H.G. (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* 145, 583-595.

Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T. and Stahl, U. (2003) Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* 43, 371-377.

- Michielse, C.B., Arentshorst, M., Ram, A.F.J. and van den Hondel, C.A.M.J.J. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 9-19.
- Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, C.P., Raina, R., Geiser, D.M. and Kamg, S. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91, 173-180.
- Orbach, M.J., Porro, E.B. and Yanofsky, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for β tubulin from a benomyl resistance mutant of *Neurospora crassa* and its use as dominant marker. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2452-2461.
- Pinto, F.G., Fungaro, M.H.P., Ferreira, J.M., Valadares-Inglis, M.C. and Furlaneto, M.C. (2002) Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genet. Mol. Biol.* 25, 231-234.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemons, L.M., MacDonald, K.D. and Bufton, A.W.J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141-238.
- Prior, C., Lomer, C.J., Herren, H., Paraiso, A., Kooyman, C. and Smit, J.J. (1992) The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locusts and grasshoppers. In: *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. (Lomer, C.J., Prior C., Eds.), pp. 8-20. CAB International: Wallingford, U.K.
- Reis, M.C., Fungaro, M.H.P., Duarte, R.T.D., Furlaneto, L. and Furlaneto, M.C. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Microbiol. Methods* 58, 197-202.
- Rho, H.S., Kang, S. and Lee, H.Y. (2001) *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells* 12, 407-411.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- St Leger, R.J. (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73, S1119-S1125 (Suppl. 1).
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. (2002) Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 91-94.
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P., Faria M.R. and Furlaneto, M.C. (2004) Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. *Can. J. Microbiol.* 50, 335-339.
- Tsuji, G., Fujii, S., Fujihara, N., Hirose, C., Tsuge, S., Shiraishi, T. and Kubo, Y. (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 69, 230-239.

Tzfira, T. and Citovsky, V. (2000) From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol. Plant Pathol.* 1, 201-212.

Valadares-Inglis, M.C. and Inglis, P.W. (1997) Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 199-202.

Table 1 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* conidia by use of benomyl selection and mitotic stability of transformants.

Plasmid present in <i>A.</i>		Number of Ben ^R transformants ^b			Percentage of mitotically stable transformants ^c
<i>tumefaciens</i> strain	AS ^a				
AGL-1	+	10	07	19	89
	-	0	0	0	
pCAB3100	+	39	45	53	97
	-	0	0	0	

^a Co-cultivations were done in the presence (+) or absence (-) of 200 μ M acetosyringone (AS). ^b Each number represent an independent transformation experiment. ^c Mitotic stability was based on growth in presence of benomyl ($13\mu\text{g ml}^{-1}$) after five serial transfers on non-selective medium (CM).

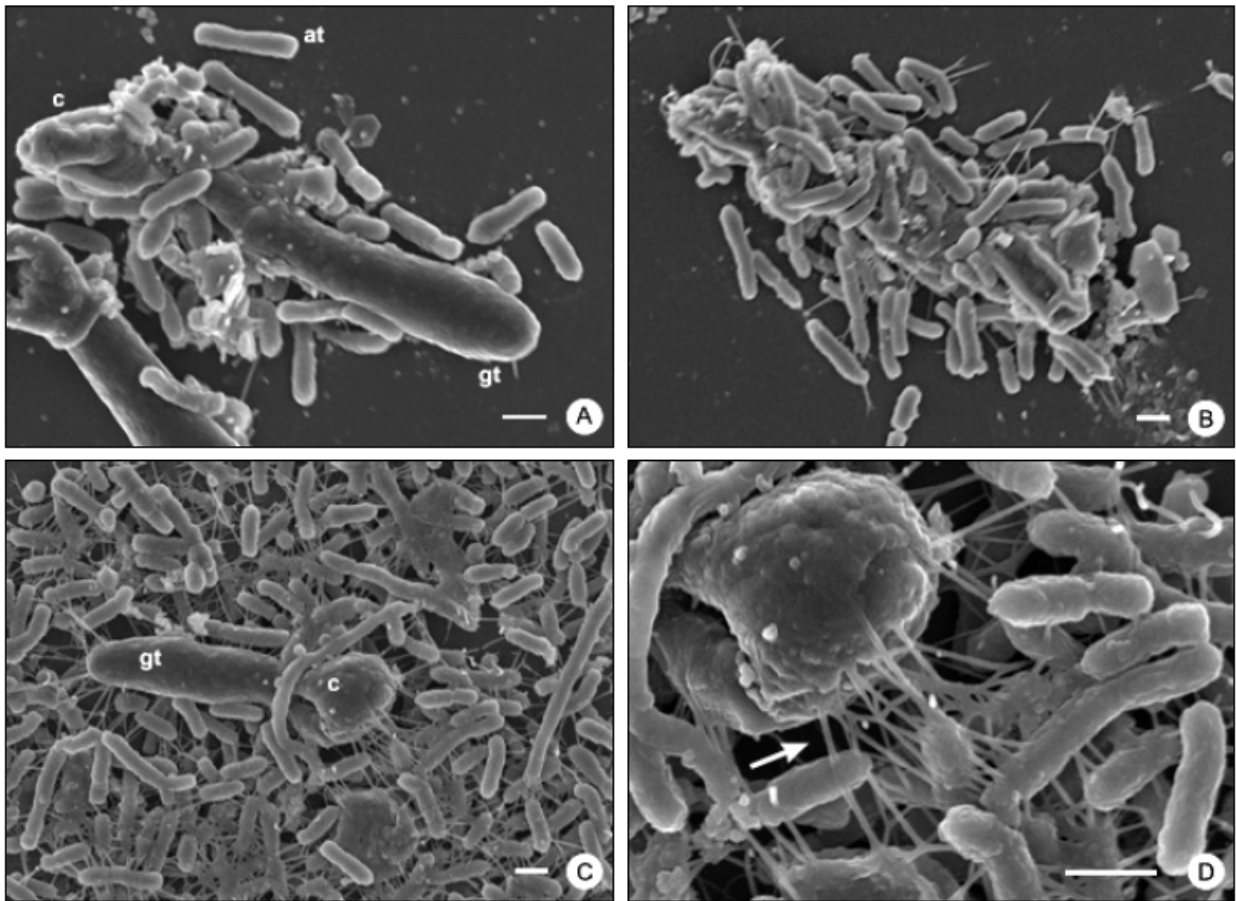


Fig. 1. *A. tumefaciens* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* interaction under co-cultivation at a Field Emission Scanning Electron Microscope. (A,B) show the attachment of *Agrobacterium* with aggregates at and around the host cells; (C,D) show the presence of fibril-like structures (arrow) connecting neighbouring cells. At: *Agrobacterium tumefaciens*; C: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia; Gt: Germinative tube; Bars = 1 μ m.

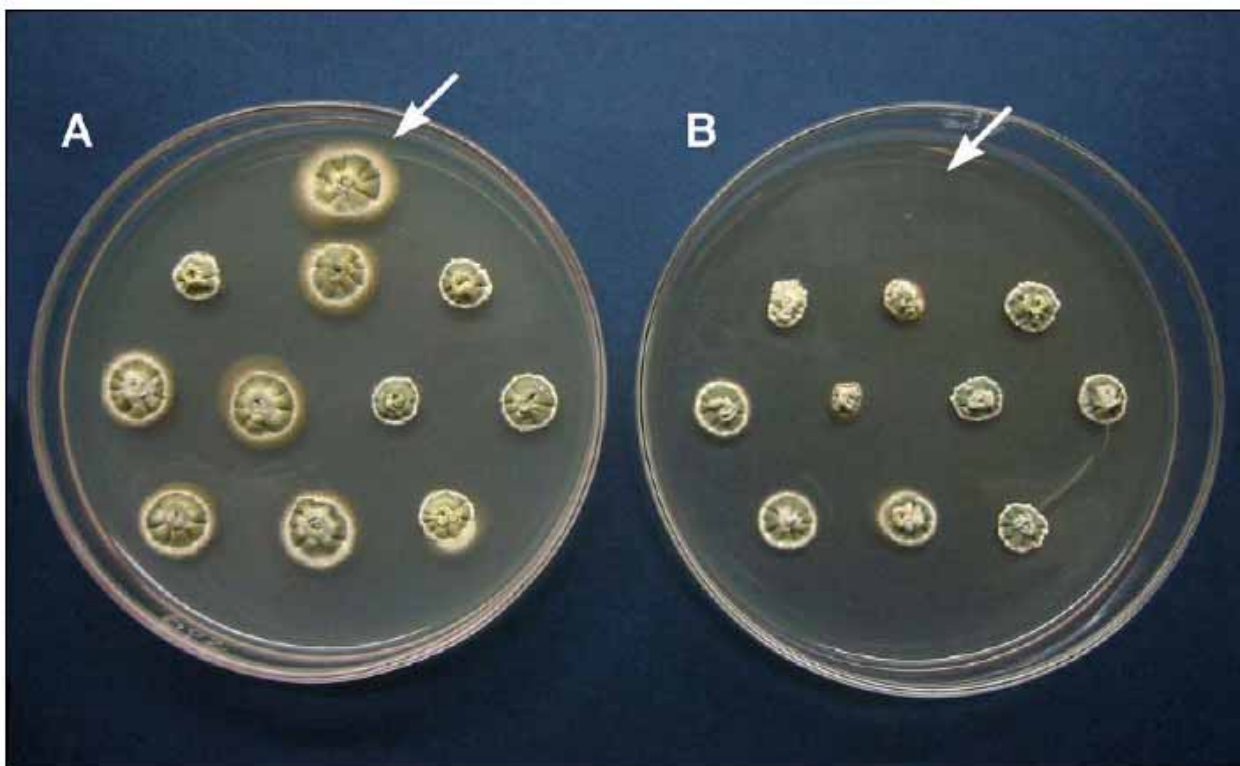


Fig. 2 Growth of wild-type strain (CG423) and 10 putative transformants on CM medium (a) and selective medium (CM plus 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ benomyl) (b). Arrows indicate wild-type CG423 inocula.

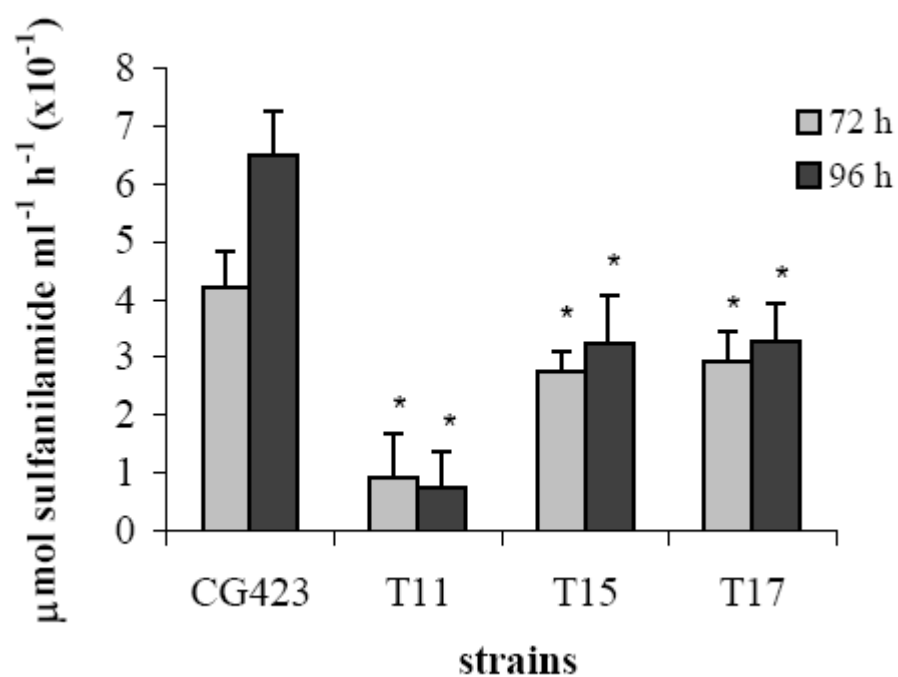


Fig. 3. Protease activity from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 and transformants. Means and standard deviations of three independent experiments are shown. The asterisk represents significant differences ($P < 0.05$) between wild-type CG423 and transformants according to the Parwise t-Test.

3 CONCLUSÕES

- A interação de AGL-1 com *M. anisopliae* var. *acridum* no co-cultivo parece ocorrer através de estruturas semelhantes a fibrilas;
- A obtenção de transformantes de *M. anisopliae* var. *acridum* via *A. tumefaciens* é dependente da presença de acetoseringone;
- A linhagem AGL-1 foi efetiva na transformação do isolado CG423;
- Vetores binários contruídos a partir de *backbones* distintos influenciou na eficiência de transformação do isolado CG423;
- A maioria dos transformantes testados apresentaram estabilidade quanto ao fenótipo de resistência ao benomil após 5 ciclos mitóticos;
- A metodologia de agro-transformação propiciou a obtenção de transformantes altamente resistentes ao benomil;
- A metodologia de agro-transformação permitiu a obtenção de mutantes com alteração de atividade proteolítica.

ANEXOS

ANEXO I - Transformação da linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* com os vetores binários pBINT6 e pCAB3100.

Células de *A. tumefaciens* (AGL-1) foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (REIS et al., 2004) e incubadas por 18 horas a 28°C a 180 rpm. Um volume de 2 mL desta cultura foi transferido para um erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido pré-aquecido. A cultura foi incubada a 28°C/180 rpm até alcançar a densidade óptica (DO600) de 0,5-1,0. Após este período, a cultura foi mantida em banho de gelo por 15 minutos, seguida de centrifugação a 5000 rpm/4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ 20 mM gelado. Foi adicionado 1 µg de DNA plasmidial (pBINT6 e pCAB3100) a um volume de 100 µL desta solução. A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e em seguida colocada em nitrogênio líquido até a suspensão congelar. Após este período, a mistura foi imediatamente transferida um banho-maria a 37°C e mantida nesta temperatura por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células incubadas por 2 horas a 28°C sob agitação (70 rpm). Por fim, as células foram centrifugadas por 30 segundos a 5000 rpm/4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 100 µL de meio LB líquido. A suspensão foi plaqueada em meio LB sólido (REIS et al., 2004) suplementado de canamicina (50 µg.mL⁻¹) e estreptomicina (50 µg.mL⁻¹), para a seleção das colônias transformadas (AGL-1::pBINT6 e AGL-1::pCAB3100) e manutenção do plasmídeo Ti desarmado, respectivamente. A cultura foi incubada por pelo menos 2 dias a 28°C para o isolamento das colônias transformantes.

ANEXO II - Ensaio de adesão entre *Agrobacterium tumefaciens* e conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG423).

A interação entre *Agrobacterium tumefaciens* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* durante o co-cultivo foi analisada sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Inicialmente foram preparadas as células bacterianas e fúngicas, seguido da montagem do sistema de co-cultivo em lamínulas de vidro (Figura 3) e finalmente a preparação das lamínulas para a microscopia eletrônica (Figura 4).

A linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*, contendo o vetor pBINT6 (Anexo 1), foi crescida em meio de cultura LB sólido (REIS et al., 2004) suplementado com o antibiótico canamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A cultura foi incubada a 28°C por 48 horas. Uma colônia desta cultura foi transferida para meio LB líquido (REIS et al., 2004) suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubada a 28°C sob agitação (180 rpm) por 24 horas. Após este período a cultura foi transferida para um novo tubo contendo o mesmo meio de cultura e incubada nas mesmas condições, até alcançar a metade da fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 6 horas). As células bacterianas foram centrifugadas a 9000g por 5 minutos a 4°C e ressuspendidas em meio de indução (MI) (REIS et al., 2004) suplementado com acetoseringona 200 μM . A concentração bacteriana desta suspensão foi ajustada para 108 células.mL⁻¹.

O isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* foi inoculado placas contendo meio completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953) e incubado a 28°C por 7 dias. A partir desta cultura, foi preparada uma suspensão de conídios em meio MI suplementado com acetoseringona 200 μM . A concentração de conídios desta suspensão foi ajustada para 106 células.mL⁻¹.

O co-cultivo foi preparado adicionando 100 μ L de cada suspensão em placas de 24 wells contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. A mistura foi ajustada para 1 mL com meio MI suplementado de acetoseringona 200 μ M, sendo de 1:100 a razão final entre células fúngicas e bacterianas. O co-cultivo foi realizado a 28°C por um período de 9 horas. O experimento também foi efetuado na ausência do composto acetoseringona em todas as etapas.

Após o período de co-cultivo, o meio de cultura foi removido e as lamínulas lavadas duas vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, as lamínulas foram fixadas com 200 μ L de glutaraldeído 2,5% (preparado em paraformaldeído 4%, ácido pícrico 0,2% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) por 2 horas à temperatura ambiente. O fixador foi removido e as lamínulas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4 preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 suplementado com ferricianeto de potássio 0,8% e CaCl_2 5 mM) por 30 minutos a 28°C. As amostras foram desidratadas em um gradiente de etanol (25%, 50%, 75%, 95% e 100%), realizado o ponto-crítico em CO_2 líquido, submersas em carbono no Balzer MED 010, e finalmente analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JEOL-JSM-6340F.

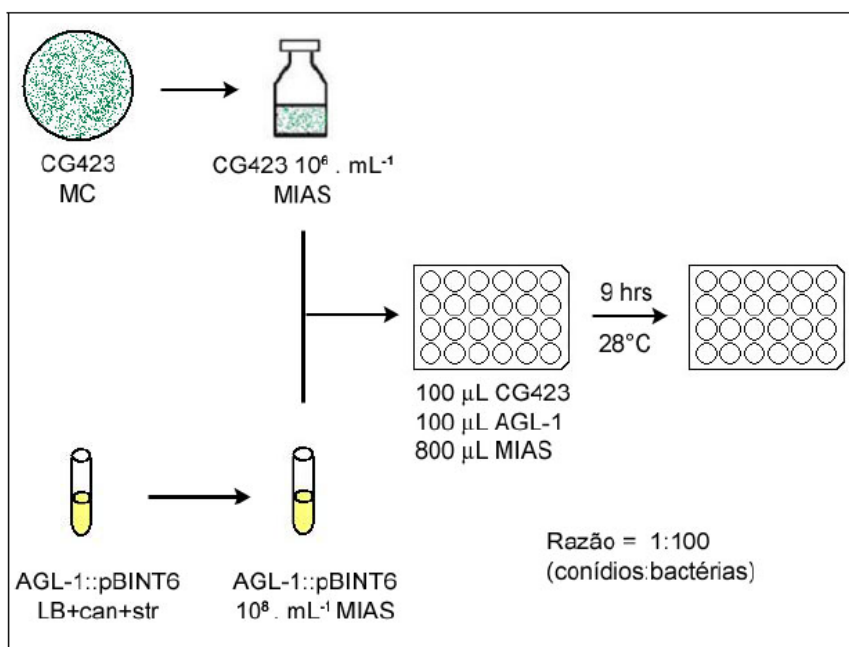


Figura 3. Preparo do sistema de co-cultivo de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* e células de *A. tumefaciens* em placas de 24 wells contendo lamínulas de 13 mm

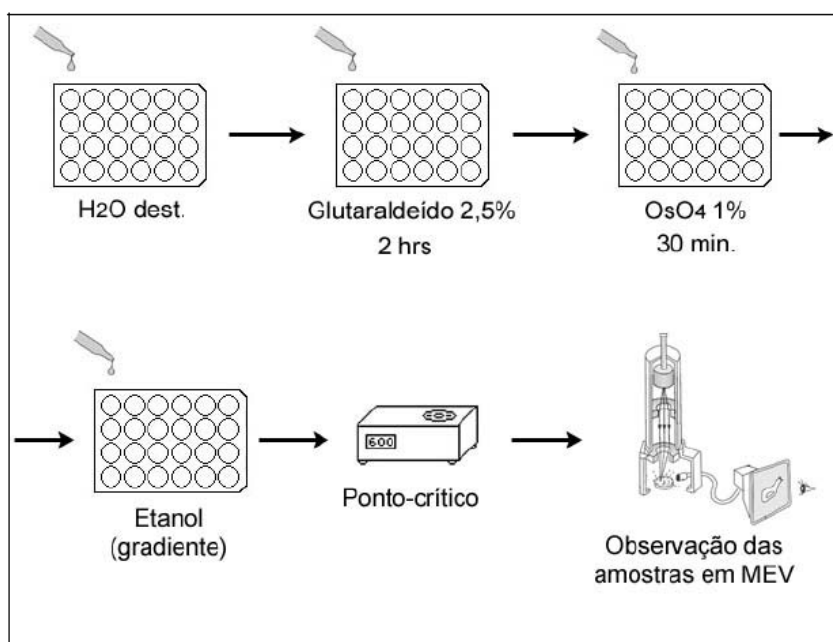


Figura 4. Preparo das lamínulas para observação em MEV.

ANEXO III - Protocolo de transformação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG423) via *Agrobacterium tumefaciens*.

A transformação de *M. anisopliae* var. *acridum* via *A. tumefaciens* foi realizada com modificações da metodologia de Reis et al. (2004). As células bacterianas e fúngicas foram preparadas em meio de indução com acetoseringona (Figura 5), seguido da montagem do sistema de co-cultivo e posterior seleção dos transformantes em meio de cultura contendo o fungicida benomil (Figura 6).

As linhagens AGL-1::pBINT6 e AGL-1::pCAB3100 de *A. tumefaciens* foram inoculadas em 7 mL de meio LB líquido contendo canamicina (50 µg.mL⁻¹) e estreptomicina (50 µg.mL⁻¹) e incubadas a 28°C sob agitação (180 rpm) durante 18 horas. Após este período, as células foram diluídas para a densidade óptica (DO660) de 0,15 em um volume final de 20 mL de meio MI contendo 200 µM de acetoseringone (MIAS). A cultura foi incubada por aproximadamente 7 horas a 28°C sob agitação (180 rpm) até a DO660 final de 0,6-0,8.

O isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* foi inoculado placas contendo meio completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953) e incubado a 28°C por 7 dias. A partir desta cultura, foi preparada uma suspensão de conídios em meio MI suplementado com acetoseringona 200 µM. A concentração de conídios desta suspensão foi ajustada para 10⁶ células.mL⁻¹.

Um volume de 100 µL da suspensão de conídios foi adicionado a 100 µL de células de AGL-1 contendo os vetores binários. A mistura foi plaqueada sobre membranas de nitrocelulose esterilizadas (90 mm de diâmetro e poros de 0.45 mm, MFS-Japan), depositadas sobre a superfície de placas de petri contendo meios MI

(controle) e MIAS solidificado. O co-cultivo foi incubado a 28°C por 36 horas. Após este período, foi acrescentado 5 mL de meio seletivo (MC contendo benomil 13 µg.mL⁻¹ e mefoxina 150 µg.mL⁻¹) sobre a membrana de nitrocelulose. As placas foram novamente incubadas a 28°C até o surgimento de colônias transformantes sobre o meio seletivo. As colônias transformantes foram isoladas em novo meio seletivo e incubadas por 21 dias a 28°C.

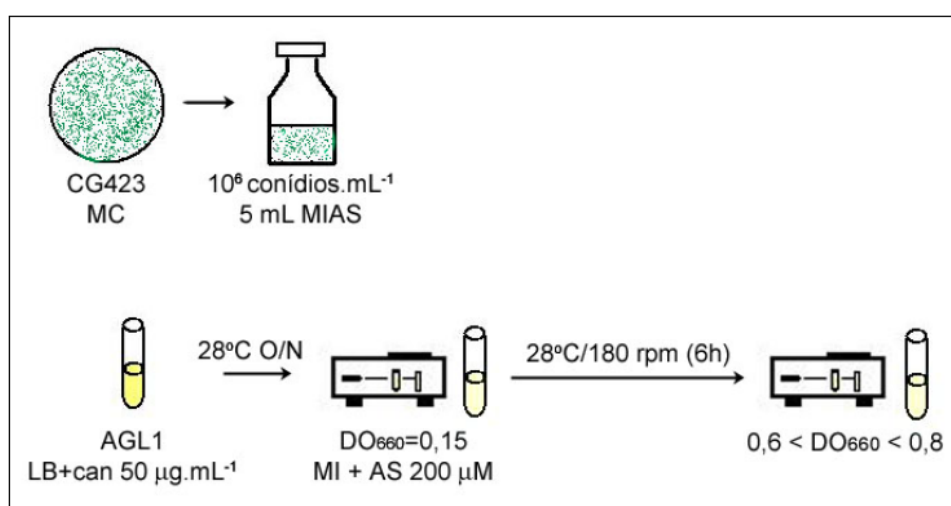


Figura 5. Preparo das células fúngicas (10^6 conídios.mL⁻¹) e bacterianas (DO_{660} 0,6-0,8) em meio de indução acrescido de acetoseringona 200 µM (MIAS)

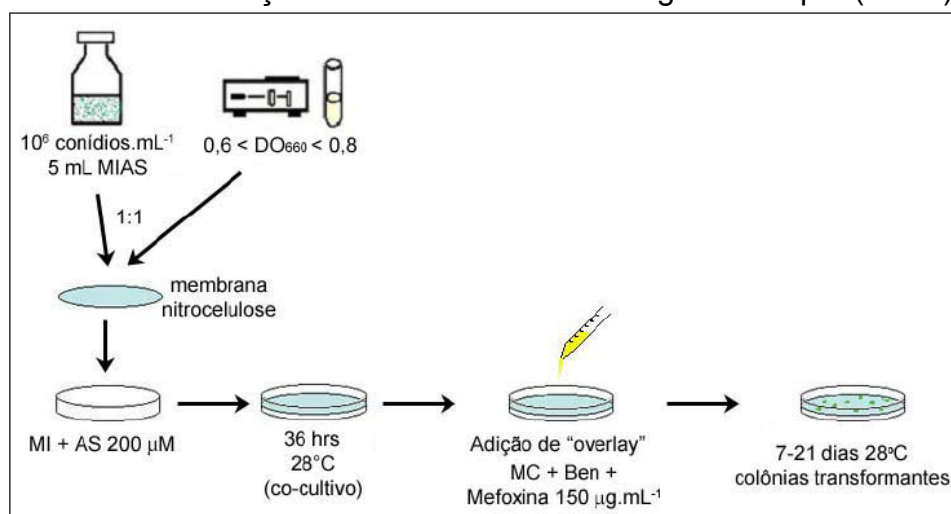


Figura 6. Preparo do sistema de co-cultivo de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* e células de *A. tumefaciens* em placas de MIAS e seleção dos transformantes.

REFERÊNCIAS

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, USA, v.5, p. 141-148, 1953.

REIS, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 197–202, 2004.