



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CLÁUDIA ALESSANDRA ANDRADE DE PAULA

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var.  
*acridum* VIA REMI

---

LONDRINA – PR  
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CLÁUDIA ALESSANDRA ANDRADE DE PAULA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* VIA  
REMI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dr.<sup>a</sup> Márcia Cristina Furlaneto

Londrina - PR

2006

CLÁUDIA ALESSANDRA ANDRADE DE PAULA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var.  
*acridum* VIA REMI**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da Universidade  
Estadual de Londrina.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Cristaina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Maria Helena P. Fungaro  
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Fernando Gomes Barcellos  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária

Londrina, 23 de fevereiro de 2006.

Aos meus pais, Oto e Sueli,  
que sempre acreditaram,  
apostaram e apostam em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos e pensamentos, permitindo-me ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Oto e Sueli de Paula, que sempre foram meus exemplos e mesmo sem entender quase nada do meu trabalho me deram apoio e incentivo.

Ao meu namorado André Fernando Pereira, por entender, por sempre ajudar em tudo, por suportar meus picos de stress e ser sempre o meu amor, meu conforto e o meu refúgio, a você meu muito obrigada.

Aos meus irmãos Douglas e Deborah de Paula, pela convivência maravilhosa da nossa família.

À professora e orientadora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pelo apoio, pelas condições de trabalho, por possibilitar e ajudar nessa conquista, sempre fazendo o melhor de si, muito obrigada mesmo.

Aos meus amigos Rubens Duarte, Ivan Lima, Bruno Dias, Marcelo Tempesta e Maria Cecília Reis, pelo aprendizado em conjunto, pelas reflexões e amizade, vocês foram muito importantes no meu Mestrado.

Aos amigos de laboratório Ana Flávia, Daniel Favero, Nane, Luiz Gustavo, Vinícius, pela amizade, e em especial ao Angelo Laranjeira, Daniel Santos e à Ariane Donati por colaborar com o resultado desse trabalho.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Helen, Karen, Cadu, Jaque, Juliana, Mateus, Thiago, Guga, Yuldi, Daniele, Lara, Andréa, Lígia, Carla, pela convivência, conversas e amizade.

Às professoras Dra. Maria Helena P. Fungaro, Luciana Furlaneto e Dra. Maria Angélica Watanabe, por ajudarem com seus laboratório, equipamentos, reagentes, conhecimentos e amizade.

À comissão examinadora da minha qualificação, André e Silvia, pelas valiosas dicas.

À Claci, pela ajuda e camaradagem no laboratório.

Aos amigos do Mestrado, em especial a Francine, Magda, Cleide, Lorraine, Ana Paula, Gustavo, Dalthon, Eduardo, Rodrigo, Tati, Renata, Nelci, Adriana, Bruno, Juliano, muito obrigada pela amizade.

À coordenação do Mestrado, em especial à Sueli, por estar sempre alegre e disposta a ajudar os alunos do programa.

Aos professores do Mestrado, pela boa vontade e dedicação.

Aos funcionários da UEL e do HC.

À UEL, à CNPQ e à Capes pelo auxílio técnico e financeiro.

Aos meus amigos Pérsia, Sandra, Andressa, Yusef, Fabrício, por estarem sempre comigo em momentos de lazer e de descontração.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com esse trabalho, meu muito obrigada!!!!

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Formulados de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> em comercialização (BUTT et al., 2001) .....	16
<b>Tabela 2</b> Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína.....	56
<b>Tabela 3</b> Eficiência de transformação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (CG423) empregando o vetor pBT6, na ausência e presença de endonuclease de restrição ( <i>Pst</i> I).....	60
<b>Tabela 4</b> Índice de Relação Enzimática da linhagem selvagem (CG423) e dos transformantes (TL20 e TL80) que apresentaram IRE estatisticamente inferior e integração ectópica e/ou homóloga do vetor no genoma.....	69
<b>Tabela 5</b> Atividade proteolítica no sobrenadante de cultivo do isolado selvagem (CG423) e transformantes, após 72 e 96 horas de incubação.....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Mapa de restrição do plasmídeo pBT6. Extraído de Orbach et al. (1986) .....	45
<b>Figura 2</b> Sequência amplificada do gene da ampicilina do plasmídeo pBT6.....	54
<b>Figura 3</b> Análise de PCR de 16 transformantes empregando os primers Amp1 e Amp2.....	66
<b>Figura 4</b> Halo de degradação do substrato caseína. Linhagem selvagem CG423 (seta) e transformantes após 72 horas de crescimento.....	68
<b>Figura 5</b> Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína da linhagem CG423 e transformantes. Os valores estão expressos em $\mu$ mol de sulfanilamida/mL/h. Os resultados representam a média de três experimentos...	72

PAULA, Cláudia A. A. **Transformação Genética do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* via REMI**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

Este trabalho compreendeu o estabelecimento da metodologia de REMI (transformação - integração mediada por endonuclease de restrição) para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. A regeneração de protoplastos foi analisada na ausência e na presença de PEG obtendo-se uma frequência que variou de 7,52 - 9,24% e 5,09 - 10,33%, respectivamente. A transformação foi realizada utilizando  $10^7$  protoplastos como células alvo e o vetor pBT6 que confere resistência ao fungicida benomil (gene *bml* de *Neurospora crassa*), nas seguintes condições: sistema tradicional protoplasto-PEG com o vetor pBT6 nas formas circular e linear (restrição com a endonuclease *Pst*I) e sistema REMI com o vetor na forma linear acrescido de 20 (TL20), 40 (TL40) e 80 (TL80) unidades de *Pst*I, sendo que as frequências de transformação obtidas foram de 8,5, 11,9, 14,8, 11,9 e 9,3 transformantes para cada  $1\mu\text{g}$  de vetor, respectivamente. Transformantes obtidos de cada condição foram selecionados aleatoriamente para a avaliação do nível de resistência e a estabilidade mitótica após cinco gerações. Quanto ao nível de resistência, 100% dos transformantes analisados apresentaram crescimento em concentração de até  $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de benomil. 100% dos transformantes testados apresentaram-se mitoticamente estáveis. A integração do vetor no genoma fúngico foi confirmada por PCR, empregando-se primers plasmídeo-específicos (*Amp1* e *Amp2*). Para tal, foram analisados um total de 200 transformantes, 50 obtidos com o vetor linear e 50 obtidos por REMI em cada uma das concentrações de *Pst*I utilizadas. O amplicon correspondente ao gene *Amp* foi detectado em 38,6%, 64,3%, 58% e 76% dos transformantes, respectivamente. Nos demais transformantes, a ausência do gene *Amp* sugere a ocorrência de integração homóloga (tipo substituição) do gene *bml* presente no vetor pBT6. Transformantes foram analisados quanto a atividade proteolítica após crescimento em presença de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides*. Três mutantes apresentaram atividade proteolítica significativamente inferior ao da linhagem selvagem. A metodologia de REMI foi efetiva na obtenção de transformantes de *M. anisopliae* var. *acridum* e permitiu a seleção de transformantes com alteração na atividade proteolítica.

Palavras chave: REMI; *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*; benomil; proteases



## ABSTRACT

**Aims:** To establish the restriction enzyme-mediated integration (REMI) method for *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a fungal pathogen of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Central Brazil and to screen mutants with altered protease production.

**Methods and Results:** Protoplasts of *M. anisopliae* var. *acridum* were successfully transformed using both the conventional protoplast-PEG and REMI methods. The number of transformants increased when low amounts of the restriction enzyme *Pst*I (20 U) was added, varying from 12.4 to 16.7 transformants  $\mu\text{g}^{-1}$  DNA. In presence of 80 U of *Pst*I transformation rate was decreased. Some 100% of the transformants tested were found to be mitotically stable and showed capacity of growing on increased concentrations of benomyl (up to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). PCR analysis with the plasmid-specific primers revealed that the percentage of transformants with integrated plasmid was 38%, 58%, 66% and 76% for transformants obtained from linear plasmid alone (TL0), and from REMI using 20, 40 and 80 U of *Pst*I, respectively. Three putative REMI-tagged mutants with a significantly lower protease production compared to the CG423 were identified after growth in the presence of grasshopper cuticle.

**Conclusions:** We efficiently transform protoplasts of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* by REMI method. The employment of this method allows the generation of mutants with altered protease production.

**Significance and Impact of the Study:** Considering the efficiency of REMI, this method may represent a useful tool for insertional mutagenesis in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, REMI, benomyl resistance.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	6
Lista de figuras.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
1 Introdução.....	11
1.1 Objetivos.....	12
2 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 Controle biológico de gafanhotos-pragas por fungos entomopatogênicos ..	13
2.2 O fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	16
2.2.1 Processo de infecção e fatores de virulência .....	19
2.3 Transformação genética de fungos filamentosos.....	27
2.3.1 Metodologias de transformação genética.....	28
2.3.1.1 Transformação genética baseada no emprego de protoplastos.....	29
2.3.1.2 Transformação genética empregando células intactas.....	31
2.3.1.3 Transformação mediada por endonuclease de restrição (REMI).....	35
2.3.2 Seleção de células transformadas.....	40
2.3.2.1 Resistência ao fungicida benomil.....	41
2.3.3 Transformação genética em fungos entomopatogênicos.....	42
3 Materiais e métodos.....	44
3.1 Microrganismos e vetor de transformação.....	44
3.1.1 Linhagem bacteriana.....	44
3.1.2 Linhagem fúngica.....	44
3.1.3 Vetor de transformação.....	45
3.2 Amplificação de DNA plasmidial (pBT6) .....	45
3.2.1 Transformação de <i>E. coli</i> .....	45
3.2.2 Extração de DNA plasmidial.....	46
3.2.3 Quantificação de DNA em gel de agarose.....	48
3.2.4 Linearização do vetor de transformação.....	48
3.2.5 Transformação de <i>Metarhizium anisopliae</i> via REMI.....	49

3.2.5.1 Obtenção de protoplastos.....	49
3.2.5.2 Transformação genética via REMI.....	50
3.2.6 Análise de estabilidade mitótica dos transformantes.....	51
3.2.7 Teste do nível de resistência.....	51
3.2.8 Extração de DNA genômico fúngico.....	52
3.2.9 Análise molecular dos transformantes (PCR) .....	52
3.3 Atividade proteolítica.....	54
3.3.1 Ensaio semi-quantitativo da produção de proteases.....	54
3.3.2 Atividade proteolítica a partir de cultivo líquido.....	55
4 Resultados e Discussão.....	57
4.1 Transformação genética de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> .....	57
4.2 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes.....	62
4.3 Teste do nível de resistência.....	63
4.4 Análise molecular dos transformantes: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) .....	64
4.5 Atividade proteolítica dos transformantes.....	66
4.6 Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína.....	70
5 Conclusões.....	73
Referências Bibliográficas.....	74
Artigo.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil sofre perdas consideráveis em diversas culturas e pastagens devido ao ataque de gafanhotos-pragas, particularmente da espécie *Rhammatocerus schistocercoides*. Os gafanhotos são uma das maiores pragas da agricultura desde a antiguidade e seu controle vem sendo realizado com inseticidas químicos, acarretando em desequilíbrio ecológico e seleção de insetos resistentes (AZEVEDO e MESSIAS, 1984). O uso de bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos tem sido uma atraente alternativa no controle de *R. schistocercoides*.

*Metarhizium anisopliae* enquadra-se como a espécie mais bem caracterizada dentre os fungos entomopatogênicos, sendo que seus diversos paratipos têm a capacidade de infectar cerca de 300 espécies de insetos pertencentes a diferentes ordens.

Em um programa de isolamento e caracterização de fungos entomopatogênicos visando o controle de *R. schistocercoides* foram avaliadas diversas linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, nas quais se destacou a linhagem CG423. Tanto em bioensaio quanto nos testes em campo, esta linhagem apresentou alta virulência (maior que 85%), tornando-se um candidato promissor para uso no controle biológico de gafanhotos-pragas.

Existem vários fatores de patogenicidade envolvidos no controle de insetos por fungos. Dentre os fatores de virulência mais bem caracterizados de *M. anisopliae* têm-se as proteases degradadoras de cutícula, dentre estas as proteases alcalinas com atividade tipo-subtilisina e tipo-tripsina.

O desenvolvimento de técnicas da engenharia genética e a aplicação destas na investigação de fenômenos biológicos, têm propiciado um rápido aumento do conhecimento sobre a biologia molecular de microrganismos entomopatógenos. A elaboração de sistemas de transformação genética para fungos entomopatogênicos representa uma ferramenta importante nos estudos de virulência, permitindo a identificação de genes e a determinação de suas funções. Além disso, o desenvolvimento de sistemas de transformação para estes fungos permite a construção de linhagens geneticamente manipuladas possibilitando o aumento de sua capacidade bioinseticida (St. LEGER et al., 1996).

A metodologia denominada REMI (Integração Mediada por Endonuclease de Restrição), a qual consiste na adição de endonuclease de restrição ao sistema de transformação que faz uso de protoplastos, tem sido empregada para fungos filamentosos visando a obtenção de mutantes, via mutagênese insercional, além de propiciar alta eficiência de transformação (MULLINS e KANG, 2001).

## 1.1 Objetivos

Os objetivos propostos para este trabalho foram:

- estabelecer a metodologia de transformação (REMI) para *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG423);
- selecionar possíveis mutantes insercionais com alteração na produção de enzimas proteolíticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Controle biológico de gafanhotos-pragas por fungos entomopatogênicos

A agricultura enfrenta grandes problemas referentes à queda na produção devido aos insetos considerados pragas. Segundo Alves (1998) estima-se que cerca de 10% das espécies conhecidas de insetos sejam consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas.

Muitas espécies de gafanhotos desenvolvem um comportamento agregativo e migratório quando há um aumento na densidade populacional, levando a formação de grandes enxames (LOMER et al., 2001). No Brasil, vinte e três espécies de gafanhotos causam danos economicamente expressivos a agricultura, embora somente três têm sido constantemente mencionadas como as mais prejudiciais: *Schistocerca pallens* (Nordeste e Distrito Federal), *Stiphra robusta* (Nordeste) e *Rhammatocerus schistocercoides* (Mato Grosso, Rondônia e Goiás). Esta última parece ter uma distribuição geográfica bem mais ampla, estando presente em algumas regiões da América do Sul e Central (EMBRAPA, 1997). 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 destruir 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).

Atualmente o principal método de controle de insetos-pragas baseia-se na aplicação de produtos químicos diretamente nas lavouras. Entretanto, os inseticidas químicos podem causar danos ambientais como o desequilíbrio ecológico e a seleção de insetos resistentes (AZEVEDO e MESSIAS, 1985). Além disso, esses inseticidas, sendo tóxicos, têm causado inúmeros acidentes, principalmente em trabalhadores rurais (AZEVEDO, 1998).

Uma alternativa ao controle químico é o controle biológico por microrganismos entomopatogênicos que oferece as vantagens de especificidade e seletividade, mantendo as populações de insetos não alvo (parasitos, predadores e polinizadores) no local a ser aplicado o bioinseticida, além da não contaminação do solo, da água e do agricultor como ocorre com o inseticida químico. Em geral, o bioinseticida é capaz de causar mortalidade em um inseto em seus diferentes estágios de desenvolvimento e em suas gerações seguintes, diminuindo a oviposição, a viabilidade de ovos e aumentando a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos (ALVES, 1998). Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos já relatada ocorre no Brasil, e mais de 20 destes incidem sobre pragas de importância econômica. Dentre estes, destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticilium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Entomophthora*. Estes fungos apresentam grande versatilidade, causando danos a artrópodes que vivem em plantas, solos e ambientes aquáticos (ALVES, 1998; SAMSON et al., 1988; TANADA e KAYA, 1993).

No entanto, há algumas desvantagens no emprego de fungos como agentes de controle microbiano, tais como a ação lenta em matar o inseto, os cuidados no armazenamento visando a manutenção da viabilidade e patogenicidade e a necessidade de condições ambientais favoráveis para seu emprego, como temperatura, umidade, luminosidade e radiação (AZEVEDO, 1998).

No contexto do controle biológico de gafanhotos-pragas, a espécie *M. anisopliae* (var. *anisopliae* e var. *acridum*) vem sendo estudada por apresentar 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).

Desde a década de 70 o Brasil comercializa *M. anisopliae* como agente controlador das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) e de pastagens (gêneros *Deois* e *Zulia*) (PARRA, 2004).

Em meados da década de 80 o governo brasileiro iniciou um programa nacional de combate ao *R. schistocercoides* visando esclarecer seu ciclo biológico e ecologia, além de propor novas estratégias de controle desta praga (BARRIENTOS, 1995). A principal ênfase deste projeto foi a busca e caracterização de inimigos naturais dos gafanhotos, onde se destacou o isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum*. O isolado foi encontrado em cadáveres de *S. pallens* (MOREIRA et al., 1996) e demonstrou ser altamente virulento para *R. schistocercoides* (85% mortalidade) e *Schistocerca pallens* (86%) (MAGALHÃES e VICENTINI, 1997; XAVIER-SANTOS et al., 1999).

Além do controle de gafanhotos, existe um aumento crescente na exploração de *Metarhizium* como agente de biocontrole de diversos insetos-praga.



Tal fato pode ser evidenciado pelo grande número de produtos já disponíveis comercialmente e em fase de desenvolvimento (Tabela 1) (BUTT et al., 2001).

**Tabela 1.** Formulados de conídios de *Metarhizium anisopliae* em comercialização.

Produto	Inseto-alvo	Produtor
Metaquino <sup>1</sup>	Cigarrinhas	Brasil
Biogreen <sup>1</sup>	Larva de escaravelho em pastagens	Biocare Technology, Austrália
Bio-Path <sup>1</sup>	Gafanhotos	EcoScience, EUA
Bio-Blast <sup>1</sup>	Cupins	EcoScience, EUA
Cobican <sup>1</sup>	Cigarrinha da cana-de-açúcar	Probiagro, Venezuela
Green Muscle <sup>2</sup>	Gafanhotos	CABI Bioscience, Inglaterra

<sup>1</sup>*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*; <sup>2</sup>*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

## 2.2 O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae* foi identificado pela primeira vez em 1879, na Rússia, quando foi isolado de larvas de um curculionídeo *Anisopliae austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae) e classificado como *Entomophthora anisopliae*.

Posteriormente, 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 et al. (2000) propuseram uma nova classificação para o gênero por meio 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  $\mu\text{m}$  (var. *anisopliae*) ou 4 a 7-11  $\mu\text{m}$  (var. *acridum* e var. *flavoviride*). A cor dos conídios varia do verde-oliva ao verde-amarelado e geralmente são uninucleados (TINLINE e NOVIELLO, 1971), com pequena proporção de binucleados (LUNA e 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 aproximadamente 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 e AZEVEDO, 1980). Análises através da eletroforese de

campo alternado (PFGE – “Pulsed Field Gel Eletrophoresis”) revelaram variações no número de cromossomos, sendo encontrado de 7 a 8 cromossomos na maioria dos isolados (VALADARES-INGLIS e PEBERDY, 1998).

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).

No caso de *M. anisopliae* var. *acridum*, os hospedeiros são restritos a gafanhotos-pragas do grupo dos acridídeos (Orthoptera: Acridoidea), como por exemplo *R. schistocercoides*, *Schistocerca pallens*, *Schistocerca gregaria* e *Stiphra robusta* (LOMER et al., 2001). O isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* foi obtido a partir de cadáver do gafanhoto *S. pallens* (Orthoptera: Acrididae) no Brasil em 1992. Desde então vem sendo estudada para o controle

de *R. schistocercoides* (“gafanhoto do Mato Grosso”) e *S. pallens* (MILNER, 1997; XAVIER-SANTOS et al., 1999).

### **2.2.1 Processo de infecção e fatores de virulência**

Existem vários fatores de patogenicidade envolvidos no controle de insetos por fungos, tornando este mecanismo multifatorial. Dentre estes fatores, têm-se a adesão à cutícula do hospedeiro, germinação do conídio, formação do apressório e grampo de penetração, penetração através da cutícula por ação mecânico-enzimática, produção de toxinas, conidiogênese e disseminação (St. LEGER et al., 1991; ALVES, 1998; CLARKSON et al., 1998).

A adesão de conídios é dependente da hidrofobicidade da superfície do inseto. A camada superficial da cutícula dos insetos, denominada epicutícula, 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%), constituindo a maior parte da cutícula (CLARKSON e 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., 1991). Segundo Lecuona et al. (1991) a adesão dos conídios à cutícula do inseto é o primeiro passo no estabelecimento da infecção.

Outro determinante de patogenicidade é a capacidade de germinação dos conídios (HEALE et al., 1989). Após a germinação, os conídios diferenciam-se em apressório, uma dilatação da hifa na extremidade do tubo germinativo que representa uma adaptação por concentrar energia física e química em uma área muito pequena, promovendo penetração eficiente. St. Leger et al. (1991) verificaram que a formação do apressório é influenciada pela topografia da cutícula e estudos bioquímicos revelaram o envolvimento de mensageiros intracelulares secundários ( $\text{Ca}^{2+}$  e cAMP) na formação dessa estrutura.

O processo químico depende da ação primária de enzimas proteolíticas na hidrólise dos componentes cuticulares, permitindo a posterior atividade de enzimas quitinolíticas. Em seguida, ocorre a colonização da hifa na cavidade interna do hospedeiro, e posteriormente a diferenciação destas em blastosporos na hemocele (BIDOCHKA et al., 1997).

Toxinas produzidas por alguns fungos entomopatogênicos têm papel importante na morte do inseto, principalmente se o fungo for capaz de matá-lo mais rapidamente (CLARKSON e CHARNLEY, 1996). *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* produzem quantidades significativas de toxinas que levam à paralisia muscular e inibição da atividade de hemócitos do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999). 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). Uma característica particular da espécie *M. anisopliae* var. *acridum* 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).

Vicentini e Magalhães (1996) investigaram a dinâmica da infecção do gafanhoto *R. schistocercoides* pelo isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* utilizando microscopia de varredura. A germinação dos conídios foi observada 12 horas após a inoculação, com posterior desenvolvimento de hifas e apressório seguido de penetração através da cutícula. Três a quatro dias após a inoculação pôde-se observar a invasão dos tecidos do inseto com a colonização da hemocele, onde o fungo se desenvolveu formando células conidiogênicas típicas e produzindo conídios. Estes germinaram formando hifas que penetraram a cutícula inversamente (de dentro para fora) após seis dias de inoculação.

O estudo detalhado das enzimas produzidas pelo gênero *Metarhizium* revelou uma série de proteases com atividade sobre a cutícula. Inicialmente, duas proteases alcalinas foram purificadas a partir do sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, denominadas Pr1 (atividade tipo-subtilisina) e Pr2 (atividade tipo-tripsina). O emprego de inibidores enzimáticos indicou 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., 1987a).

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 presença de 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., 1994a; 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*, como única 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 e b; St. LEGER et al., 1998). Clarkson e Charnley, (1996) relataram que a adição de glicose ou alanina durante a germinação do conídio de *M. anisopliae in vitro* reprime a formação do apressório e a expressão de protease tipo-Pr1, sugerindo a ocorrência de regulação coordenada por repressão catabólica. O mesmo foi confirmado para Pr2, ocorrendo repressão catabólica na presença de glicose ou aminoácidos (St. LEGER et al., 1987a e b; PATERSON et al., 1993).

Pinto et al. (2002) analisaram a produção de proteases extracelulares (Pr1 e Pr2) por isolados de *M. anisopliae var. acridum*, a partir do cultivo em meio contendo cutícula de *R. schistocercoides* e substratos não cuticulares. 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. 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 (PINTO, 1999).

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 e 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 e St. LEGER, 1999), além de quatro isoformas da enzima Pr1 (Pr1A, Pr1B, Pr1E e Pr1F) e três isoformas de Pr2 (St. LEGER, 1994).

Diversos trabalhos relatam a clonagem de genes que codificam proteases degradadoras de cutícula. St. Leger et al. (1992) isolaram e caracterizaram o cDNA de Pr1 de *M. anisopliae*. A análise da seqüência revelou que a estrutura primária da Pr1 é muito similar a serino-endopeptidases da subclasse das subtilisinas e que os resíduos de serina, histidina e aspartato do sítio ativo das subtilisinas estão presentes. Joshi et al. (1997) utilizaram a técnica de RT-DD-PCR para identificar genes diferentemente expressos por *M. anisopliae* na presença de cutícula. O gene que codifica para uma protease tipo-subtilisina obtido pelos autores foi denominado *pr1B* (para diferenciar do primeiro gene encontrado que passou a ser denominado *pr1A*). A análise da seqüência de aminoácidos revelou que Pr1B apresenta similaridade de 54% com Pr1A e uma análise de cariótipo mostrou que os genes *pr1A* e *pr1B* estão em cromossomos distintos.

Freimoser et al. (2003) realizaram estudo de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de duas variedades de *M. anisopliae* (var. *anisopliae* e var. *acridum*). O

padrão de ESTs revelou uma grande quantidade de proteases produzidas por ambas as espécies, incluindo subtilisinas, tripsinas, quimotripsinas, metaloproteases, aspartilproteases, aminopeptidases e carboxipeptidases. Nesse estudo foram encontradas seqüências relacionadas a diversos fatores de virulência em ambas as variedades, dentre as quais diversas subtilisinas (11 para *M. anisopliae* var. *anisopliae* e 3 para *M. anisopliae* var. *acridum*), das quais 7 não haviam sido relatadas anteriormente (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 variedades. *M. anisopliae* var. *acridum* tem como característica invadir todos os tecidos do hospedeiro, levando o inseto à morte (INGLIS et al., 2001). *M. anisopliae* var. *anisopliae* mata o hospedeiro pela produção de toxinas, seguido de crescimento saprofítico no interior do inseto (SAMUELS et al., 1989).

O número e diversidade de subtilisinas encontradas em *M. anisopliae* tem gerado novas concepções acerca da interação *Metarhizium*-hospedeiro. Até o momento foram identificadas 11 e 7 subtilisinas em *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, respectivamente. As análises de seqüências destas subtilisinas suportam a idéia de que tenha ocorrido duplicação de genes no 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, podem 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 hábitats 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 aminoácidos 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 em fungos filamentosos**

A transformação genética representa um sistema de recombinação a qual promove a incorporação de DNA exógeno no interior de células hospedeiras.

Os sistemas de transformação compreendem a existência de vetores contendo marcas de seleção e de mecanismos que possibilitam sua introdução em células receptoras. Os vetores empregados na transformação de fungos filamentosos constituem-se, em geral, de DNA plasmidial de origem bacteriana nos quais são incorporadas marcas seletivas apropriadas para fungos. A introdução do DNA transformante pode ser conduzida por diferentes métodos e agentes, que serão melhor abordados adiante.

O primeiro relato de transformação em fungos filamentosos data de 1973, quando um mutante de *Neurospora crassa* auxotrófico para inositol foi transformado para prototrofia com o gene selvagem (MISHRA e TATUM, 1973). No entanto, os resultados foram considerados dúbios, considerando a baixa eficiência do processo e a falta de reprodutibilidade e análise molecular, havendo suspeitas de ocorrência de reversão espontânea.

Posteriormente, metodologias de transformação para fungos filamentosos começaram a ser desenvolvidas, sendo que o emprego de células desprovidas de parede (protoplastos) na transformação ocorreu pela primeira vez em 1979 em *N. crassa* (CASE et al., 1979) seguido da transformação de *Aspergillus nidulans* em 1983 (TILBURN et al., 1983). Desde então, metodologias de transformação vem sendo descritas para uma grande diversidade de espécies fúngicas (DÍEZ, 2002).

### **2.3.1 Metodologias de transformação genética**

O processo de transformação de fungos filamentosos compreende as seguintes etapas: 1) preparo de células competentes para o recebimento do DNA exógeno, 2) indução da entrada deste DNA e 3) seleção de colônias transformadas através de pressão seletiva, de modo que somente as que receberam a nova característica consigam sobreviver, ao expressarem a informação contida no DNA exógeno (van den HONDEL e PUNT, 1990; MULLINS e KANG, 2001).

As metodologias hoje disponíveis são diversas, sendo que algumas utilizam células desprovidas de parede celular, tais como, pelo emprego do agente químico

polietilenoglicol - PEG (PEBERDY, 1991) e eletroporação (WARD et al., 1988) (apud van den HONDEL e PUNT, 1990). Já outras metodologias utilizam células intactas como: bombardeamento de células com microprojéteis contendo DNA transformante (biobalística) (ARMELO et al., 1990) e nos últimos anos tem-se descrito o processo de transferência gênica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (agro-transformação) (BUNDOCK et al. 1995; De GROOT et al. 1998).

### **2.3.1.1 Transformação genética baseada no emprego de protoplastos**

A obtenção de células desprovidas de parede (protoplastos) tem sido o método mais comum para se preparar células competentes para a transformação (DÍEZ, 2002). Os protoplastos podem ser obtidos de diferentes tipos celulares, sendo mais comum a utilização de micélio jovem ou tubos germinativos. No entanto, a escolha do tipo de célula que será usada para a obtenção dos protoplastos é uma questão de conveniência, considerando as possibilidades de melhores resultados (MULLINS e KANG, 2001; DÍEZ, 2002).

Após a escolha do tipo celular, faz-se necessária a remoção da parede celular, uma barreira à entrada do DNA exógeno, por meio de tratamento lítico. Para a digestão da parede celular é utilizado um concentrado de enzimas líticas. Nesta etapa a presença de estabilizador osmótico é essencial para a manutenção da integridade dos protoplastos formados. Os estabilizadores utilizados são os

mais variados, sendo que os mais utilizados são a sacarose, cloreto de potássio, sorbitol e sulfato de magnésio (MULLINS e KANG, 2001; DÍEZ, 2002).

A entrada do DNA transformante é promovida pelo tratamento dos protoplastos com íons cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e pela ação caotrópica do composto polietilenoglicol (PEG). À suspensão de protoplastos (em estabilizador osmótico e tampão) adiciona-se cloreto de cálcio, PEG e o DNA. 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 e TURNER, 1985).

A principal vantagem desse sistema convencional é o baixo custo dos reagentes e equipamentos quando comparados aos outros sistemas, podendo ser incluído facilmente na rotina da maioria dos laboratórios. Entretanto, apesar de ser comum, esta técnica necessita de uma série de otimizações nas etapas de obtenção e regeneração dos protoplastos. Segundo Peberdy (1991) dentre os principais fatores envolvidos na protoplastização têm-se o estado fisiológico das células a serem convertidas em protoplastos, o estabilizador osmótico que proporcione alto número de protoplastos e alta frequência de regeneração, e o composto lítico utilizado (preferencialmente com atividade proteolítica, quitinolítica e de  $\beta$ -1,3 glucanase) que pode influenciar tanto na obtenção como na regeneração dos protoplastos, uma vez que enzimas com atividades mais específicas liberam mais protoplastos mas tornam a regeneração mais lenta.

Posteriormente a metodologia tradicional de protoplasto-PEG, surgiu a eletroporação. Esta técnica 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 e STACEY, 1990). Embora tenha permitido a obtenção de um maior número de transformantes em relação ao PEG/CaCl<sub>2</sub>, 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).

A eletroporação foi primeiramente empregada na transformação dos fungos *Fusarium solani* e *A. nidulans* (RICHEY et al., 1989), sendo que posteriormente foi expandida para diversas outras espécies, inclusive para *M. anisopliae* (St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996).

### **2.3.1.2 Transformação genética empregando células intactas**

No geral, os métodos baseados no emprego de protoplastos, não são eficientes quanto a frequência de obtenção de transformantes, além disso, algumas espécies fúngicas são recalcitrantes quanto a obtenção de protoplastos.



A eficiência dos sistemas de transformação foi aumentada quando Sanford et al. (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 (ARMELO et al., 1990). O primeiro relato da transformação de fungos por biobalística foi com a levedura *S. cerevisiae* (ARMELO 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 e MAGAE, 2002).

Outra metodologia de transformação empregando-se células intactas baseia-se na utilização de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria é um bacilo aeróbico encontrado no solo e é responsável por causar tumores em células vegetais (KADO, 1991). Durante a formação do tumor, a bactéria transfere parte do seu plasmídeo Ti (tumor inducing), seqüência denominada T-DNA, para a

célula vegetal, a qual é eficientemente integrada no genoma da célula hospedeira. O plasmídeo Ti tem cerca de 200 kilobases e nele se encontram os genes *vir* que codificam proteínas essenciais envolvidas no processamento e transferência do T-DNA para a célula hospedeira. 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*.

A região de T-DNA é flanqueada por duas seqüências curtas (25 pares de bases) denominadas de borda direita (RB) e borda esquerda (LB), que são essenciais para o processo de infecção. Os plasmídeos Ti das linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas para a transformação *in vitro* não possuem os oncogenes do T-DNA, mas conservam os genes de virulência (região *vir*), sendo denominado de vetor desarmado ou “helper”. 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 (HOEKEMA 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 *in vitro* do vetor binário contendo praticamente qualquer seqüência clonada entre as bordas esquerda e direita.

A aplicação desta metodologia para a transformação de fungos foi descrita primeiramente por Bundock et al. (1995) empregando *S. cerevisiae*, seguido do trabalho de De Groot et al. (1998) os quais transformaram espécies distintas de fungos filamentosos. Atualmente, esta metodologia foi descrita para diversas espécies fúngicas como revisado por MICHIELSE et al. (2005).

Na transformação genética mediada por *A. tumefaciens* é comum a ocorrência de integração aleatória de T-DNA em sítios únicos no genoma da célula hospedeira, particularmente quando emprega-se genes heterólogos (De GROOT et al., 1998; CHEN et al., 2000; MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; MALONEK e MEINHARDT, 2001; MEYER et al., 2003; COMBIER et al., 2003; LECLERQUE et al., 2004). Tal característica tem estimulado o emprego desta metodologia como ferramenta na obtenção de mutantes (mutagênese insercional), visando a caracterização de genes relacionados a fatores de virulência (TSUJI et al., 2003).

Por outro lado, vetores binários têm sido construídos contendo seqüências homólogas ao genoma da célula hospedeira, visando a integração da região de T-DNA em sítios específicos (GOUKA et al., 1999; ZWIERS e WAARD, 2001; MULLINS e KANG, 2001).

### 2.3.1.3 Transformação Mediada por Endonuclease de Restrição (REMI)

A metodologia de transformação mediada por endonuclease de restrição é uma variante do método de protoplasto-PEG. A metodologia de REMI baseia-se na adição de endonuclease de restrição ao sistema de transformação (vetor linearizado com a mesma endonuclease e suspensão de protoplastos). Neste processo, a endonuclease de restrição penetra pelas membranas celular e nuclear da célula hospedeira, juntamente com o vetor de transformação, clivando o DNA cromossomal *in vivo* em seu respectivo sítio de restrição. Este evento possibilita a integração do vetor em diferentes pontos do genoma da célula, pela geração de sequências expostas, as quais são compatíveis com as sequências expostas do vetor, possibilitando a inserção deste no genoma da célula hospedeira. Desta forma, a metodologia de REMI pode resultar na obtenção de mutantes via mutagênese insercional.

No entanto, a ocorrência de integrações aleatórias ao longo do genoma da célula alvo é incerta, visto que alguns trabalhos relatam a integração preferencial em um mesmo locus (SWEIGARD et al., 1998; LU et al., 1994). Isto pode ser devido ao fato de que, regiões do genoma com alta taxa de transcrição podem ser mais susceptíveis a digestão por endonucleases de restrição do que aquelas que são pouco ou não transcritas (MULLINS e KANG, 2001).

Normalmente, a quebra causada pela ação da endonuclease nos cromossomos é reparada ou pela incorporação do vetor ou pela religação mediada pelo sistema de reparo da célula hospedeira. No entanto, este

mecanismo pode falhar causando deleções ou rearranjos durante o processo de transformação. Este problema pode ser parcialmente resolvido pela otimização da concentração e o tipo de enzima de restrição a ser utilizado para clivar o genoma hospedeiro. Altas concentrações de enzima de restrição ao mesmo tempo que podem produzir maior número de eventos de integração, podem também causar danos à célula, resultando em diminuição na eficiência de transformação (MULLINS e KANG, 2001).

Na transformação genética em que o DNA plasmidial é utilizado nas formas circular ou linear, sem a adição de endonuclease de restrição, a integração ectópica (heteróloga) do vetor de transformação normalmente ocorre “em tandem” (várias cópias repetidas na mesma inserção) o que tem dificultado a clonagem de genes nocauteados via mutagênese insercional (FOTHERINGHAM e HOLLOMAN, 1990).

Em fungos filamentosos a transformação via REMI normalmente resulta em integrações heterólogas e em cópias únicas do DNA exógeno no genoma da célula hospedeira (BOLKER et al., 1995; SCHIESTL e PETES, 1991; KUSPA e LOOMIS, 1992).

A técnica do REMI é semelhante às técnicas de etiquetagem por transposon. A maior vantagem do REMI é que provê meios de interromper genes aleatoriamente por inserção plasmidial e subseqüente clonagem desses genes por resgate dos plasmídios em *Escherichia coli* (“plasmid rescue”) (SÁNCHEZ et al., 1998).

A mutagênese insercional tem como objetivo a interrupção de genes de forma eficiente e aleatória em um organismo alvo, provocando nos organismos transformantes alterações fenotípicas. Através da seleção dos organismos que apresentam estas alterações, pode-se resgatar o gene nocauteado do genoma do organismo hospedeiro. A recuperação de seqüências de DNA genômico que flanqueiam o plasmídeo integrado pode ser realizada através da restrição do DNA genômico total da célula transformada com endonucleases de restrição que não cortam o plasmídeo, seguido de transformação de *E. coli*. Os plasmídeos resgatados (contendo seqüências de DNA genômico) podem ser re-introduzidos no hospedeiro, onde por recombinação homóloga poderá restabelecer o fenótipo mutante original. Desta forma, o emprego de REMI tem permitido a clonagem de genes de interesse (BÖLKER et al., 1995).

Adicionalmente, o emprego de REMI tem resultado na maioria dos trabalhos em altas freqüências de transformação (GRANATO et al., 1997; SANCHEZ et al., 1998).

A metodologia de REMI foi primeiramente empregada em *S. cerevisiae* por Schiestl e Petes em 1991; desde então são vários os relatos de transformação utilizando esta técnica. Dentre os trabalhos podemos observar dois objetivos principais: o aumento da freqüência de transformação (SCHIESTL e PETES, 1991; SHI et al., 1995; GRANADO et al., 1997; SATO et al., 1998; THON et al., 2000), e a obtenção de mutantes para posterior clonagem de genes que foram nocauteados (KUSPA e LOOMIS, 1992; LU et al., 1994; EPSTEIN et al., 1998; CANTONE e VANDENBERG, 1999; THON et al., 2000; KIM et al., 2004).

Shi et al. (1995) relataram um aumento na eficiência de transformação de *Magnaporthe grisea* pelo emprego de REMI sendo este dependente da endonuclease utilizada. Segundo estes autores, a frequência de transformação variou com o tipo e com a quantidade de endonuclease utilizada e foi observado que com o aumento de endonuclease no sistema de transformação, houve um declínio no número de transformantes.

O emprego de REMI na transformação de *Coprinus cinereus* utilizando diferentes endonucleases de restrição resultou no aparecimento precoce de transformantes e uma alta frequência de transformação em concentrações adequadas para cada enzima. Estes autores também observaram que em concentrações muito elevadas de enzima ocorreu diminuição na eficiência de transformação. Desta forma, para o emprego de REMI, a concentração da enzima que possibilite a obtenção de um maior número de transformantes deve ser definida experimentalmente, aumentando a possibilidade de obtenção de mutantes desejados (GRANADO et al., 1997).

Para o basidiomiceto comestível *Lentinus edodes*, o emprego de REMI resultou num aumento de 10 vezes no número de transformantes obtidos (Sato et al., 1998). Da mesma forma, Sanchez et al. (1998) demonstraram que o emprego de REMI para *Aspergillus nidulans* possibilitou um aumento no número de transformantes obtidos bem como na obtenção de mutantes para conidiação, o que não ocorreu na transformação via eletroporação.

Cantone e Vanderberg (1999) empregaram a metodologia de REMI para o fungo entomopatogênico *Paecilomyces fumosoroseus* e concluíram que essa

técnica não aumentou a eficiência de transformação como descrito na literatura para outros fungos. No entanto, o emprego de REMI aumentou a frequência de transformantes cuja integração do plasmídeo ocorreu em cópia única.

Thon et al. (2000) empregaram a técnica de REMI para *Colletotrichum graminicola* e descreveram um aumento na eficiência de transformação mesmo empregando-se o vetor na forma circular. Segundo estes autores, 51% dos transformantes analisados por Southern continham uma única cópia do vetor integrado no genoma do hospedeiro.

Outra aplicabilidade da metodologia de REMI baseia-se na obtenção de mutantes visando a clonagem de genes (completa ou parcial) (KUSPA e LOOMIS, 1992; LU et al., 1994; EPSTEIN et al., 1997; CANTONE e VANDERBERG et al., 1999; CUMMINGS et al., 1999; THON et al., 2000; KIM et al., 2002).

Um dos primeiros trabalhos de clonagem de genes pelo emprego de REMI foi descrito por Kuspa e Loomis (1992) utilizando o fungo mixomiceto *Dictyostelium discoideum*. Estes autores descreveram alta eficiência na obtenção de mutantes via mutagênese insercional, e através da estratégia de “plasmid rescue” foi demonstrado que a maioria dos fenótipos mutantes estavam relacionados à integração do DNA exógeno.

O emprego de REMI em *Cochliobolus heterostrophus* permitiu a clonagem de parte do gene *Tox1* que codifica a produção da toxina T a partir de 2 mutantes obtidos, de um total de 1310 mutantes analisados (LU et al., 1994).

Mutantes de *Colletotrichum graminicola* com alteração na coloração de conídios foram também obtidos pela metodologia de REMI (Epstein et al., 1997).



Mutantes de *P. fumosoroseus* com alteração na capacidade de esporulação e virulência também foram obtidos pelo emprego de REMI (CANTONE e VANDERBERG et al., 1999).

Cummings et al. (1999) obtiveram mutantes de *Coprinus cinereus* com esporulação alterada na frequência de 1,2%. A análise molecular revelou que em 66% dos mutantes obtidos, a alteração na conidiogênese foi decorrente da inserção do plasmídeo utilizado. Através da PCR semi-randômica foi possível a clonagem do gene *spo11*.

O emprego de REMI também propiciou a obtenção de mutantes deficientes quanto a produção de laccases em *Coprinus congregatus* (Leem et al., 1999) e *Ganoderma lucidum* (Kim et al., 2004).

O emprego de REMI também permitiu a identificação de genes relacionados a patogenicidade do fungo fitopatógeno *Colletotrichum graminicola*. Através de ensaio de virulência *in vitro*, de um total de 660 mutantes analisados, 41 apresentaram virulência aumentada e 2 apresentaram virulência reduzida (Thon et al., 2000). Da mesma forma, genes de *Trametes versicolor* relacionados a produção de peroxidase foram também clonados (KIM et al., 2002).

### **2.3.2 Seleção de células transformadas**

A seleção dos organismos transformados depende da expressão dos genes marcadores, que conferem o fenótipo seletivo adequado. Os marcadores de seleção dominantes permitem a seleção de linhagens selvagens. Como

desvantagem para este tipo de marcador tem-se que um alelo para resistência, pode não exercer dominância sobre o alelo selvagem causando problemas na seleção de transformantes. Em sua maioria, são genes que conferem resistência a drogas, embora existam também aqueles correspondentes a genes que conferem marcas nutricionais (van den HONDEL e PUNT, 1990; DÍEZ, 2002).

### **2.3.2.1 Resistência ao fungicida benomil**

O benomil é um agente antimicótico benzimidazólico utilizado na agricultura como fungicida. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da função dos microtúbulos, componentes essenciais do citoesqueleto de células eucarióticas. A ação inibidora de benomil na função dos microtúbulos parece estar associada à afinidade desse composto à proteína  $\beta$  - tubulina dos microtúbulos (OAKLEY, 1992). A resistência aos benzimidazoles está associada a mutações na  $\beta$  - tubulina, como por exemplo o gene  $\beta$  - *tub*-BenR , uma substituição de aminoácido na posição 167 (Phe  $\rightarrow$  Tyr), clonado de *Neurospora crassa* por Orbach et al (1986). Genes que codificam para  $\beta$  - tubulinas resistentes ao benomil têm sido utilizados como marcadores de seleção no desenvolvimento de sistemas de transformação, incluindo *N. crassa* (ORBACH et al., 1986) e *M. anisopliae* (BERNIER et al., 1989; BOGO et al., 1996; FURLANETO et al., 1999).

### 2.3.3 Transformação genética de *Metarhizium anisopliae*

A transformação genética de fungos entomopatogênicos representa uma ferramenta adicional no estudo e melhoramento de sua capacidade bioinseticida. Pela transformação é possível expressar genes relacionados a virulência, bem como o nocaute destes genes através de mutagênese insercional.

Através da introdução de genes relacionados à virulência, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou eficiência melhorada contra *Manduca sexta* (ST. LEGER et al., 1996). 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.

Para *Metarhizium anisopliae* já foram descritos os principais métodos de transformação: protoplasto-PEG (BERNIER et al., 1989; GOETTEL et al., 1990, BOGO et al., 1996; VALADARES-INGLIS e INGLIS, 1997; FURLANETO et al., 1999), eletroporação (St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996), biobalística (St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996) e via *Agrobacterium tumefaciens* (DUARTE, 2005). No geral, as freqüências de transformação foram baixas quando do emprego da metodologia de protoplasto-PEG.

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/ $\mu\text{g}$  de DNA). Entretanto, esta eficiência de transformação foi maior quando comparada ao uso da biobalística em *M. anisopliae* (5 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA) (ST. LEGER et al., 1995).

A transformação do isolado CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum* pelo método de *A. tumefaciens* resultou em eficiências de transformação comparáveis às obtidas pelo emprego de biobalística (39-53 transformantes/ $10^5$  conídios) (DUARTE, 2005).

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

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos e vetor de transformação

##### 3.1.1 Linhagem bacteriana

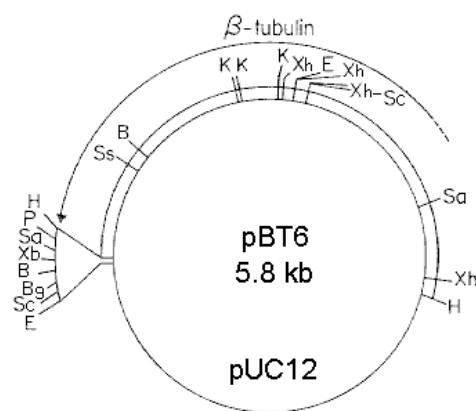
A linhagem TOP10F': F' {*lacIq*, Tn10 (*TetR*) mer A  $\Delta$  (*mrr-hsd RMS-merBC*)  $\theta$  80 *lacZ*  $\Delta$  m15  $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 ara D139  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galK rpsL* (*strR*) *end A1 nupG*} de *E. coli* foi utilizada para a amplificação do plasmídeo pBT6.*

##### 3.1.2 Linhagem fúngica

A linhagem CG423 de *M. anisopliae* var. *acidum* utilizada como hospedeira na transformação genética foi obtida da coleção de fungos entomopatogênicos da Cenargen/Embrapa-DF/Brasil.

### 3.1.3 Vetor de transformação

O plasmídeo pBT6 (Figura1) que contém o gene de resistência ao fungicida benomil, gene da  $\beta$ -tubulina de *Neurospora crassa* (*bml*), foi utilizado como vetor na transformação genética de *M. anisopliae* var. *acridum*.



**Figura 1.** Mapa de restrição do plasmídeo pBT6. Extraído de Orbach et al. (1986).

## 3.2 Amplificação de DNA plasmidial (pBT6)

### 3.2.1 Transformação de *E. coli*

A linhagem TOP 10 de *E. coli*, foi crescida por 18 horas em 3 mL de meio LB – Lúria Bertani (SAMBROOK E RUSSEL, 2001) à 37°C sob agitação. Foram

adicionados 150  $\mu\text{L}$  da cultura crescida em 5 mL de meio LB e essa nova cultura foi incubada por 1 hora nas mesmas condições. Após esse período, a cultura foi aliquoteada em tubos de microcentrífuga e colocada em gelo por 5 minutos e em seguida centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  500mM e deixado em banho de gelo por 10 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 1 minuto a 4°C, e então após o descarte do sobrenadante foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  500mM ao sedimento e aguardados 20 minutos. Um volume de 50  $\mu\text{l}$  de células competentes foi aliquoteado e, à essas células, foram adicionados 5  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial (pBT6). A mistura foi mantida no gelo por 20 minutos; adicionou-se 1 mL de meio LB líquido, seguido de incubação a 37°C por 1 hora sob agitação. Após esse período, o material foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{l}$  de LB e esse volume foi plaqueado em meio LB + ampicilina 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . A cultura foi incubada por 24 horas à 37°C.

### 3.2.2 Extração de DNA plasmidial (mini-prep)

Células de *E. coli* transformadas foram crescidas por 18 a 22 horas a 37°C em tubos contendo 3 mL de meio LB contendo 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  de ampicilina. A cultura foi centrifugada a 12000 rpm a 4°C por 3 minutos, posteriormente foi descartado o

sobrenadante e o sedimento celular foi ressuspendido em 100  $\mu\text{l}$  de solução GTE (glicose 40%, EDTA 0,5M pH 8,0, Tris-HCl 1M pH 8,0) . Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (NaOH 1M, SDS 10%), seguido de agitação por vortex, com posterior banho de gelo por 10 minutos. Foram adicionados 150  $\mu\text{l}$  de acetato de sódio 3M pH 5,0 com posterior mistura branda e banho de gelo por 20 minutos. Após esse período o material foi centrifugado a 10000 rpm 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado clorofane (fenol 50%, 48% clorofórmio, 2% álcool isoamílico) na proporção 1:1, em relação ao sobrenadante, seguido de mistura por inversão. A próxima etapa foi de centrifugação a 12000 rpm 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga, e neste tubo foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto gelado; então o material foi mantido a -20°C por 18 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em etanol 70%. O material foi centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos; o sobrenadante foi descartado e o sedimento secado por 1 hora à temperatura ambiente e ressuspendido em 50  $\mu\text{l}$  de tampão TE (Tris-HCl 1M pH 7,6, EDTA 0,5M pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{l}$  de RNAase 10  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  com incubação a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Para interromper a reação, a temperatura foi elevada para 100°C por 5 minutos com posterior resfriamento à temperatura ambiente.



### 3.2.3 Quantificação de DNA em gel de agarose

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%. A amostra utilizada como padrão para quantificação foi o DNA do fago  $\lambda$  nas concentrações de 50 ng, 100 ng, 200 ng e 300 ng. A corrida eletroforética foi realizada utilizando-se uma voltagem de  $3.v.cm^{-1}$ . A concentração do DNA plasmidial obtida foi estimada através da comparação da intensidade das bandas.

### 3.2.4 Linearização do vetor de transformação

Para a transformação genética da linhagem CG423 de *M. anisopliae* var. *acidum*, o vetor pBT6 foi linearizado com a endonuclease de restrição *Pst*I, a qual possui um único sítio de restrição localizado na região do *polylinker* (Figura 1). Esta enzima tem como característica a geração de extremidade coesivas.

Para cada micrograma de DNA plasmidial foi utilizada três unidades de enzima; sendo que a clivagem foi realizada a 37°C por 4 horas com a posterior inativação à 60°C por 20 minutos.

### 3.2.5 Transformação de *M. anisopliae* var. *acridum* via REMI

A metodologia de transformação pode ser dividida em duas etapas: a obtenção de protoplastos e a transformação genética propriamente dita.

#### 3.2.5.1 Obtenção de protoplastos

Foi inoculada uma suspensão de conídios em 100 mL de meio MC – meio completo (PONTECORVO et al., 1953), na concentração final de  $10^7$  conídios. mL<sup>-1</sup>. O inóculo foi incubado por 48 horas a 28°C sob agitação de 180 rpm, para a obtenção de micélio. Após este período, o micélio formado foi filtrado em filtro de 30 µm e lavado com estabilizador osmótico KCl 0,7M (KCl 0,7M, tampão fosfato 0,2M pH 5,8) . Após, o micélio foi pesado e colocado em solução lítica, de modo que, para cada 100 mg de micélio foi adicionado 1mL da solução lítica (5 mg. mL<sup>-1</sup>). Esta mistura foi incubada por 2 horas a 28°C sob agitação de 55 rpm. Após este período, a solução foi filtrada e posteriormente aliqotada em microtubos para posterior centrifugação a 4000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em KCl 0,7M; este procedimento foi repetido mais duas vezes para lavagem dos protoplastos. A estimativa do número de protoplastos obtido foi realizada na câmara de Neubauer.

### 3.2.5.2 Transformação genética via REMI

A um volume de 100  $\mu\text{l}$  de protoplastos na concentração de  $10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ , foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  de KCL 0,7M. Os seguintes sistemas de transformação foram montados: 1) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor circular (pBT6); 2) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor na forma linear (*PstI*); 3) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor linear mais 10 unidades de *PstI*; 4) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor linear mais 20 unidades de *PstI*; 5) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor linear mais 40 unidades de *PstI* e 6) adição de 10  $\mu\text{g}$  de vetor linear mais 80 unidades de *PstI*. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas por inversão e colocadas em banho de gelo por 20 minutos. Após este período, foi adicionado 12,5  $\mu\text{l}$  de solução de PEG – polietilenoglicol (PEG 25%,  $\text{CaCl}_2$  50 mM, Tris – HCl 10 mM pH 7,5), e mantido novamente em banho de gelo por mais 20 minutos. Em seguida foi adicionado 300  $\mu\text{l}$  de solução de PEG em cada um dos tratamentos. Após homogeneização. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido este período, foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de estabilizador  $\text{MgSO}_4$  0,5M ( $\text{MgSO}_4$  0,5M, tampão fosfato 0,2M pH 5,8) com posterior centrifugação por 20 minutos à 5500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  0,5M. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições, para remoção de resíduo de PEG. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  0,5M, seguido de plaqueamento em meio completo contendo estabilizador osmótico ( $\text{MgSO}_4$  0,5M). As placas foram incubadas por 48 horas

seguido da adição de *overlay* (7 mL de meio completo) contendo benomil na concentração de  $13 \mu\text{g mL}^{-1}$  (dobro da concentração que inibe o crescimento da linhagem selvagem).

Para a determinação do efeito deletério do PEG sobre a regeneração de protoplastos, foram realizados dois sistemas: a) protoplastos na ausência de PEG e b) protoplastos na presença de PEG; sem adição de DNA plasmidial e de endonuclease *Pst*I.

### **3.2.6 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes**

A análise de estabilidade mitótica foi realizada através do crescimento dos transformantes em meio não-seletivo (MC) por cinco passagens consecutivas, seguido de inóculo em meio de cultura seletivo (MC +  $13 \mu\text{g. mL}^{-1}$  de benomil).

### **3.2.7 Teste do nível de resistência.**

O nível de resistência dos transformantes foi testado através do seu crescimento em meio completo contendo concentrações crescentes do fungicida benomil ( $13, 25, 50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2.8 Extração de DNA genômico fúngico

Uma suspensão de conídios dos transformantes foi inoculada em 10 mL de meio completo líquido contendo benomil ( $13\text{ug. mL}^{-1}$ ) e incubados sob agitação de 180 rpm a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. O micélio obtido foi filtrado e transferido para um tubo de microcentrífuga. Foi adicionado a esse tubo 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0), 500  $\mu\text{L}$  de clorofane (fenol 50%, 48% clorofórmio, 2% álcool isoamílico) e 6 pérolas de vidro, sendo posteriormente agitado vigorosamente em vórtex por 2 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido a um tubo novo. Foi adicionado ao sobrenadante etanol absoluto gelado e levado ao freezer por 3 horas para a precipitação do DNA. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi seco por aproximadamente 1 hora. Após este período foi acrescentado 15  $\mu\text{L}$  de água milliQ esterilizada para a eluição do DNA.

### 3.2.9 Análise molecular dos transformantes: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Um total de 100 transformantes, 50 obtidos no tratamento de 20U de *Pst*I e 50 obtidos no tratamento 80U de *Pst*I foram selecionados aleatoriamente. A reação de PCR foi realizada com os primers Amp1 e Amp2 (Figura 2) que

amplificam uma sequência de 418 pb do gene da ampicilina presente no vetor pBT6. A reação foi realizada num volume final de 20  $\mu$ l, contendo os seguintes reagentes: 2  $\mu$ l de tampão 10x (Invitrogen - Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM, 1x concentrado), 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen - 2,5 mM), 1,4  $\mu$ l dNTP (Pharmacia Biotech - 25 pmol), 1  $\mu$ l primer Amp 1 (Invitrogen - 20 pmol), 1  $\mu$ l primer Amp 2 (Invitrogen - 20 pmol), 0,1  $\mu$ l Taq DNA Polimerase (Invitrogen - 0,5 unidades), 2  $\mu$ l de amostra de DNA genômico (5 – 10  $\mu$ g), 11,5  $\mu$ l água bidestilada. A mistura da reação foi submetida ao termociclador previamente programado para 30 ciclos após desnaturação inicial de 7 minutos a 94 °C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de 3 etapas: desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (56°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 1,5 minutos). Ao final dos 30 ciclos foi realizada uma extensão final a 72°C de 5 minutos. Após a amplificação, as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio e foram fotografados.

---

**GTCCTGCAACTTTATCCG**CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT  
AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTAC  
AGGCATCGTGGTGT CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT CAGCTCCGGT  
TCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG  
TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA  
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGT  
AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGG  
TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGC**GTC AATACGGGATAATACC**

---

**Figura 2.** Sequência amplificada do gene da ampicilina do plasmídeo pBT6.

Primer *Amp1*: 5' GTCCTGCAACTTTATCCG 3'; Primer *Amp2*: 5'  
GGTATTATCCCGTATTGAC 3'.

### 3.3 Atividade proteolítica

#### 3.3.1 Ensaio semi- quantitativo da produção de proteases

A avaliação da produção de exoenzimas por fungos em meios solidificados foi idealizada por Hankin e Anagnostakis (1975). Segundo estes autores, a determinação da atividade enzimática baseia-se no halo de degradação de substratos.

A linhagem selvagem (CG423) e os transformantes analisados foram inoculados em MM – meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953) solidificado sem NaNO<sub>3</sub> e sem glicose contendo caseína (0,2%) e incubados à 28° C por 48 horas. Após este período determinou-se o índice de relação enzimática (IRE) calculado pela razão entre o diâmetro do halo + diâmetro da colônia pelo diâmetro da

colônia. Este experimento foi repetido três vezes e, a partir da média dos valores e dos desvios obtidos, comparou-se a atividade enzimática dos transformantes com a do selvagem utilizando o teste T pareado.

### 3.3.2 Atividade proteolítica a partir de cultivo líquido

Os transformantes que apresentaram atividade proteolítica em meio solidificado estatisticamente inferior a do isolado selvagem foram crescidos em MM acrescido de cutícula de *Rhammatocerus schistocercoides* (0,5%) por 7 dias a 28°C. Uma suspensão de conídios ( $5 \times 10^6$  conídios/mL) foi inoculada em MM líquido acrescido de cutícula de *R. schistocercoides* (0,5%) seguido de incubação a 28°C e a 180 rpm. Alíquotas do sobrenadante de cultivo foram retiradas em intervalos de 72 e 96 horas, filtradas e armazenadas em freezer a -20°C.

A atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína foi determinada segundo o método descrito por Charnley e Tomarelli (1947), baseado na liberação de sulfanilamida pela hidrólise da azocaseína. Quando hidrolisada, a azocaseína libera aminoácidos ou oligopeptídeos não precipitáveis por ácidos fortes como o ácido tricloroacético (TCA) ou ácido perclórico (PCA) e estes podem ser quantificados por espectrofotometria em comprimento de onda de 440 nm.

A determinação da atividade enzimática do sobrenadante de cultivo foi realizada utilizando tubos em duplicata, segundo a Tabela abaixo:



**Tabela 2** Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína

<b>Tubos</b>	<b>Tris-HCl 0,2 M pH 8,5</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Substrato 1 g%</b>	<b>Sobrenadante</b>
C-	0,06 mL	0	0,015 mL	0,451 mL*
Branco	0,06 mL	0,451 mL	0,015 mL	0
Teste	0,06 mL	0	0,015 mL	0,451 mL

C- Controle negativo

Sobrenadante aquecido a aproximadamente 98°C/10 minutos.

Após incubação em banho-maria a 28°C por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 0,3 mL de solução de TCA 10%, e os tubos mantidos em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga e submetidas à centrifugação por 84000 rpm por 5 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 0,3 mL de NaOH 2N para neutralizar as amostras, seguido de repouso por 10 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 440 nm e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{mol}$  de sulfanilamida/mL/h.

Este experimento foi repetido três vezes e a atividade proteolítica dos transformantes foi comparada ao do isolado selvagem por teste estatístico (T pareado,  $p < 0.05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Transformação genética de *M. anisopliae* var. *acridum*.

A metodologia de REMI foi realizada utilizando-se o vetor pBT6 (que contém o gene estrutural da  $\beta$ -tubulina de *N. crassa*) e o sistema protoplasto-PEG.

Para a obtenção de protoplastos, conídios da linhagem CG423 foram inoculados em meio completo sendo que o período de incubação para a obtenção do micélio o qual foi submetido a protoplastização foi estabelecido em 48 horas. Neste período de incubação observou-se predominância de micélio jovem (mais susceptível a liberação de protoplastos) com pouca quantidade de conídios não germinados.

Os estabilizadores osmóticos utilizados para a obtenção e regeneração de protoplastos de *M. anisopliae* var. *acridum* (CG423) foram KCl 0,7M e MgSO<sub>4</sub> 0,5M, respectivamente. Segundo Furlaneto et al. (1999), o emprego destes estabilizadores resultou em alta eficiência de obtenção e de regeneração de protoplastos para esta linhagem.

Para a transformação genética alguns parâmetros foram otimizados, dentre estes, a concentração de PEG utilizada no sistema e o período de incubação prévio à pressão seletiva (adição de meio contendo benomil).

Previamente aos experimentos de transformação, foi analisado o possível efeito deletério do agente fusogênico polietilenoglicol (PEG) sobre a regeneração dos protoplastos. A frequência de regeneração dos protoplastos em ausência de PEG variou de 7,52 – 9,24%, enquanto que na presença de PEG foi de 5,09 – 10,33%, não sendo portanto observado um efeito deletério deste agente fusogênio. Nestes experimentos, a concentração de PEG foi reduzida em 70% e 40% comparativamente a concentração previamente utilizada por Valadares-Inglis e Inglis (1997) e Furlaneto et al. (1999), respectivamente, para a mesma linhagem (CG423). Furlaneto et al. (1999) relataram uma frequência de regeneração de protoplastos 10 vezes menor na presença de PEG comparativamente ao sistema sem PEG. Já Valadares-Inglis e Inglis (1997) descreveram uma redução de 10 a 25 vezes na frequência de regeneração. Este efeito deletério do PEG havia sido anteriormente descrito para outros fungos filamentosos (CHURCHILL et al., 1990; ULHOA et al., 1992).

O tempo de incubação, prévio à pressão seletiva foi otimizado sendo que os melhores resultados foram obtidos em 48 horas. Neste período o crescimento residual de colônias não transformadas foi mínimo. Cantone e Vandenberg (1999) estabeleceram que o melhor tempo de incubação foi de 15 horas previamente à pressão seletiva resultando em um aumento significativo na eficiência de transformação de *Paecilomyces fumosoroseus*.

O surgimento de colônias resistentes em meio seletivo (MC+13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de benomil) foi observado após 15 dias de incubação a 28°C.

As freqüências de transformação obtidas pelo método de protoplasto-PEG para *M. anisopliae* var. *acridum* variaram de 7,2–9,2 e 11,7–12,8 transformantes/ $\mu$ g de DNA do vetor pBT6, na forma circular e linear, respectivamente (Tabela 3).

A eficiência de transformação do presente trabalho foi superior à descrita por Furlaneto et al. (1999) que obtiveram freqüências de transformação de 2,1 – 3,6 transformantes/ $\mu$ g de vetor circular. A eficiência de transformação foi também superior às descritas para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (BERNIER et al., 1989; GOETTEL et al., 1990; BOGO et al., 1996), que variou de 0,08, a 1,8 transformantes/ $\mu$ g de DNA. Já Valadares-Inglis e Inglis (1997) obtiveram freqüências superiores (15 - 84 transformantes/ $\mu$ g de DNA) para *M. anisopliae* var. *acridum*.

Na transformação de *Magnaporthe grisea* (SHI et al., 1995) e *Lentinus edodes* (Sato et al., 1998) foi observado que as maiores freqüências de transformação foram obtidas quando da utilização de vetor na forma linear. Estes resultados sugerem que a integração do DNA na forma linear no genoma fúngico se dá mais facilmente do que o DNA na forma circular.

Tais resultados demonstram a importância da otimização dos fatores envolvidos na transformação genética, particularmente no que se refere a obtenção e regeneração dos protoplastos. A maior freqüência de transformação obtida neste trabalho provavelmente se deve, em parte, a redução da concentração de PEG, que teve o seu efeito deletério minimizado como observado pelas freqüências de regeneração obtidas na sua ausência e presença. Tunlid et

al. (1999), empregaram diferentes concentrações de PEG (40%, 30%, 20%, 15% e 10%) na transformação de *Arthrobotrys oligospora* e obtiveram 0,2; 0,5; 3,1; 2,7; e 0,8 transformantes/ $\mu$ g de DNA plasmidial, respectivamente.

As freqüências de transformação obtidas empregando-se REMI (adição de endonuclease de restrição *Pst*I) variaram de 12,4-16,7; 11,6-12,3; 7,7-10,8 transformantes/ $\mu$ g de DNA do vetor pBT6 na presença de 20, 40 e 80 unidades da enzima, respectivamente (Tabela 3). Um total de 2200 transformantes foram obtidos os quais foram estocados visando posteriores análises moleculares e seleção de possíveis mutantes insercionais.

**Tabela 3** Eficiência de transformação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (CG423) empregando o vetor pBT6, na ausência e presença de endonuclease de restrição (*Pst*I)

Sistema de transformação	Número de transformantes*			Média $\pm$ SD
DNA circular	9,2	9,2	7,2	8,5 $\pm$ 1,15
DNA linear	12,8	11,2	11,7	11,9 $\pm$ 0,82
DNA linear + 20 unidades de enzima	12,4	15,5	16,7	14,8 $\pm$ 2,22
DNA linear + 40 unidades de enzima	11,6	12,3	11,9	11,9 $\pm$ 0,35
DNA linear + 80 unidades de enzima	7,7	10,8	9,6	9,3 $\pm$ 1,56

\*Os valores representam o número de transformantes obtido em três experimentos individuais por 1µg de DNA plasmidial.

Como pode-se observar, na transformação por REMI em presença de 20 unidades de enzima houve uma tendência de aumento na eficiência de transformação. Já na presença de 80 unidades da enzima houve decréscimo na eficiência de transformação, sugerindo que em altas concentrações de *Pst*I pode estar ocorrendo um efeito citotóxico (RIGGLE e KUMAMOTO, 1998).

Resultados semelhantes foram descritos para diversas espécies fúngicas (KUSPA e LOOMIS, 1992; LU et al., 1994; SHI et al., 1995; GRANADO et al., 1997; SATO et al., 1998; LEEM et al., 1999; CANTONE e VANDENBERG, 1999; ROGERS et al., 2004) onde a adição de endonuclease de restrição resultou em aumento na eficiência de transformação, sendo que em altas concentrações houve decréscimo no número de transformantes obtidos.

Bolker et al. (1995) observaram que o uso de vetor circular na ausência e na presença de enzima de restrição no sistema de transformação não alterou a frequência de transformação. O mesmo foi relatado por Leem et al. (1999), mas quando foi adicionado vetor linearizado na transformação por REMI, houve um aumento significativo no número de transformantes obtidos.

Granado et al. (1997) utilizaram somente vetor circular nos sistemas de transformação e observaram que a eficiência aumentava dependendo da enzima e da concentração aplicada, sugerindo que a eficiência de transformação por REMI é dependente do tipo e concentração da enzima utilizada.

Quanto aos fungos entomopatogênicos, até o momento, somente *Paecilomyces fumosoroseus* foi transformado pela metodologia REMI (Cantone e Vandenberg, 1999). Segundo estes autores, a eficiência de transformação foi dependente do tipo e da quantidade de enzima empregada na transformação. O maior número de transformantes obtido foi de 102 transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA. A seleção do banco de transformantes obtidos revelou a ocorrência de mutantes com alterações na esporulação e virulência contra afídeos.

#### **4.2 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes**

A estabilidade mitótica de 75 transformantes obtidos de cada sistema de transformação foi analisada, conforme item 3.2.6. Um total de 100% dos transformantes analisados para cada um dos tratamentos apresentaram estabilidade genética após 5 gerações mitóticas. A estabilidade mitótica de transformantes de *M. anisopliae* foi também analisada por outros autores (GOETTLE et al., 1990; St. LEGER et al., 1995; BOGO et al., 1996; FURLANETO et al., 1999; INGLIS et al., 2000; DUARTE et al., 2005), sendo que em nenhum dos trabalhos citados foi descrito 100% de estabilidade mitótica.

Furlaneto et al. (1999) descreveram que 66% dos transformantes de CG423 foram mitoticamente estáveis após 5 ciclos mitóticos. Já a estabilidade mitótica de transformantes do mesmo isolado obtido pela metodologia de *Agrobacterium tumefaciens* foi de 97% (DUARTE, 2005).

Para *M. anisopliae* var. *anisopliae* St. Leger et al. (1995) observaram que 40% dos transformantes obtidos por eletroporação e por biobalística apresentaram-se mitoticamente estáveis. Resultados similares foram obtidos por Bogo et al. (1996).

Dentre os trabalhos de REMI descritos na literatura, são poucos os relatos de análise de estabilidade mitótica de transformantes. Granado et al. (1997) relatou que menos de 50% dos transformantes de *Coprinus cinereus* obtidos por REMI apresentaram perda parcial ou completa (menos que 10%) da estabilidade mitótica.

#### **4.3 Teste do nível de resistência**

Um total de 28 transformantes, obtidos de cada sistema de transformação, foi analisado quanto ao nível de resistência ao fungicida benomil, conforme descrito no item 3.2.7.

Este teste revelou que 100% dos transformantes testados apresentaram resistência a alta concentração do fungicida ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cerca de 15 vezes superior a concentração que inibe a linhagem selvagem ( $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por Duarte (2005). Já Valadares-Inglis e Inglis (1997) descreveram que 60% dos transformantes de *M. anisopliae* var. *acridum* analisados apresentaram crescimento em até  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (maior concentração testada).



Esta alta resistência adquirida pode ser resultante da integração de múltiplas cópias do vetor no genoma fúngico, ou ainda, devido a integração do vetor em regiões de alta taxa de expressão gênica.

#### **4.4 Análise molecular dos transformantes: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

A integração do vetor pBT6 nos transformantes foi confirmada por PCR empregando os primers *Amp1* e *Amp2* como descrito no item 3.2.9.

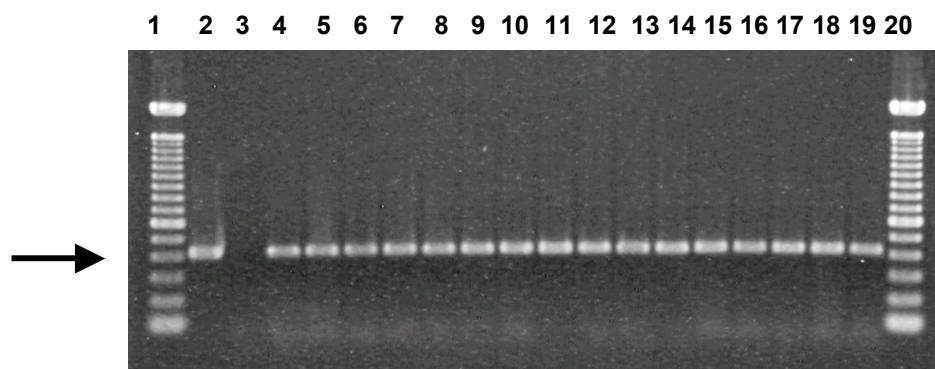
Um total de 200 transformantes, 50 obtidos na transformação protoplasto-PEG e vetor na forma linear (TL0) e 150 obtidos empregando-se REMI em presença de 20U de *Pst*I (50 TL20), 40U de *Pst*I (50 TL40) e 80U de *Pst*I (50 TL80) foram selecionados aleatoriamente para a análise da presença do gene *Amp* presente no vetor pBT6. A presença do amplicon (418 pb) foi observada em 38,6%, 64,3% , 58% e 76% dos transformantes, respectivamente, como ilustrado na Figura 3. Este resultado sugere a ocorrência de integração ectópica e/ou homóloga do vetor no genoma dos transformantes, uma vez que a seqüência do gene da ampicilina foi detectada. Nenhum produto de amplificação foi observado quando o DNA da linhagem CG423 foi utilizado como template na reação de PCR (Figura 3).

A ausência do amplicon nos demais transformantes testados se deve provavelmente a ocorrência de integração homóloga do tipo substituição, onde o gene da  $\beta$ -tubulina de *N. crassa* presente no vetor foi substituído pelo gene

endógeno de *M. anisopliae* var. *acidum*. Neste tipo de evento, provavelmente tenha ocorrido crossing duplo, estando ausente a seqüência do vetor, particularmente do gene *Amp*. A possibilidade de ocorrência de conversão gênica é respaldada pelas características fenotípicas dos transformantes (estabilidade mitótica e alta resistência ao fungicida benomil) conferida pelo gene de resistência *bml* do vetor utilizado na transformação. Além disso, na transformação genética de *M. anisopliae* com o gene *bml* de *Neurospora* tem sido relatado alta freqüência de transformantes onde este tipo de integração foi confirmada (Bogo et al., 1996; Valadares-Inglis et al., 1997).

Bogo et al. (1996) demonstraram por Southern e PCR que em 67% dos transformantes de *M. anisopliae* testados ocorreu conversão gênica. Já Valadares-Inglis et al. (1997) observaram por Southern que 100% dos transformantes analisados tiveram o mesmo tipo de integração.

Kim et al. (2004) também empregaram PCR com utilização de primers plasmídeo-específico para a detecção de integração do vetor em transformantes de *Ganoderma lucidum*.



**Figura 3.** Análise de PCR de 16 transformantes empregando os primers Amp1 e Amp2. Amplificação controle (seta) do vetor de transformação pBT6 (2), ausência de amplificação na linhagem selvagem CG423 de *M. anisopliae* var. *acidum* (3), produto de amplificação dos transformantes TL0 (4 - 7), TL20 (8 - 11), TL40 (12 - 15) e TL80 (16 - 19). Marcador de peso molecular (100 pb) (1 e 20).

#### 4.5 Atividade proteolítica dos transformantes em meio solidificado

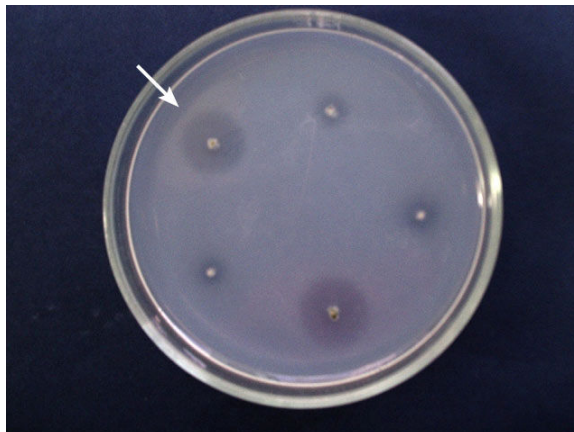
Enzimas proteolíticas produzidas por *M. anisopliae* desempenham papel importante na penetração da cutícula do hospedeiro (St. LEGER, 1995; SMALL e BIDOCHKA, 2005). O estudo detalhado das enzimas produzidas por esta espécie revelou uma série de proteases degradadoras de cutícula, particularmente proteases do tipo-Pr1 e tipo-Pr2 (St. LEGER, 1994), embora outros tipos proteolíticos também foram descritos (CHARNLEY e St. LEGER, 1991; COLE et al., 1993; St. LEGER et al., 1998; JOSHI e St. LEGER, 1999).

Uma vez que a metodologia de REMI pode gerar mutantes insercionais e que estes podem ser selecionados quanto a alterações fenotípicas, um total de 74 transformantes (31 TL20 e 43 TL80) cuja integração do vetor foi confirmada, foi

analisado quanto a atividade proteolítica em meio solidificado contendo caseína como fonte de nitrogênio. Os transformantes testados foram obtidos na transformação de REMI em presença de 20U e 80U de enzima. A atividade proteolítica foi expressa em IRE, baseada no halo de degradação da caseína, como ilustrado na Figura 4.

Na Tabela 4 estão indicados os transformantes que apresentaram IRE inferior ao da linhagem CG423 e cuja integração ectópica e/ou homóloga do vetor no genoma foi confirmada por PCR. A atividade proteolítica foi expressa pela razão entre o diâmetro da colônia mais o halo de degradação do substrato e diâmetro da colônia. Um total de 22 transformantes apresentou IRE igual a 1,0 indicando a ausência de halo de degradação do substrato.

A obtenção de transformantes que apresentaram IRE e atividade proteolítica estatisticamente inferior à linhagem selvagem, além de e presença da amplificação do gene *Amp* por PCR, sugere a possibilidade de ocorrência de mutagênese insercional pela integração do DNA exógeno no genoma destes transformantes. Tal integração pode ter ocorrido em genes relacionados ao “turnover” protéico, ou mesmo em genes relacionados à produção de proteases degradadoras de cutícula.



**Figura 4.** Halo de degradação do substrato caseína após 72 horas de cultivo. Linhagem selvagem CG423 (seta) e 4 transformantes escolhidos aleatoriamente.

**Tabela 4** Índice de Relação Enzimática da linhagem selvagem (CG423) e dos transformantes (TL20 e TL80) que apresentaram IRE estatisticamente inferior e integração ectópica e/ou homóloga do vetor no genoma. Os resultados representam os valores médios de três experimentos  $\pm$  desvio padrão da média.

Linhagem	Atividade proteolítica	Linhagem	Atividade proteolítica
CG423	2,94 $\pm$ 0,6	TL80 26	1 $\pm$ 0
TL20 06	1,6 $\pm$ 0,24	TL80 36	1 $\pm$ 0
TL20 15	1,27 $\pm$ 0,2	TL80 45	1 $\pm$ 0
TL20 57	1,5 $\pm$ 0,4	TL80 47	1,46 $\pm$ 0,21
TL20 86	1 $\pm$ 0	TL80 57	1 $\pm$ 0
TL20 155	1 $\pm$ 0	TL80 59	1 $\pm$ 0
TL20 208	1 $\pm$ 0	TL80 77	1 $\pm$ 0
TL80 02	1 $\pm$ 0	TL80 118	1 $\pm$ 0
TL80 04	1 $\pm$ 0	TL80 122	1 $\pm$ 0
TL80 06	1 $\pm$ 0	TL80 132	1 $\pm$ 0
TL80 07	1 $\pm$ 0	TL80 139	1 $\pm$ 0
TL80 13	1 $\pm$ 0	TL80 140	1,47 $\pm$ 0,18
TL80 19	1 $\pm$ 0	TL80 151	1 $\pm$ 0
TL80 21	1 $\pm$ 0	TL80 153	1 $\pm$ 0
TL80 24	1,3 $\pm$ 0,2	TL80 182	1,47 $\pm$ 0,16

#### 4.6 Atividade enzimática sobre o substrato natural azocaseína

Um total de 8 transformantes (4 TL20 e 4 TL80) foram testados quanto a produção de proteases após crescimento em meio mínimo contendo cutícula do gafanhoto *R. schistocercoides* como fonte única de nitrogênio. A determinação da atividade enzimática foi realizada empregando o substrato azocaseína que permite a detecção de um “pool” de proteases.

Como observado, após 72 horas de incubação, sete transformantes apresentaram atividade proteolítica estatisticamente inferior comparativamente a do selvagem (CG423): TL20 06, 86, 155, 208 e TL80 07, 26 e 59 (Teste t pareado,  $P < 0.05$ ). Já no tempo de 96 horas de incubação, somente três destes transformantes TL20 06, 155, 208 apresentaram atividade inferior e nenhum transformante TL80 apresentou atividade proteolítica estatisticamente inferior ao do selvagem (Tabela 5, Figura 5).

A obtenção de transformantes que apresentaram índice de relação enzimática e atividade proteolítica estatisticamente inferiores ao da linhagem selvagem sugere a possibilidade de ocorrência de mutagênese insercional, pela integração aleatória do plasmídeo no genoma destes transformantes. Tal integração pode ter ocorrido em genes relacionados ao “turnover” protéico, ou mesmo em genes relacionados a produção de proteases degradadoras de cutícula, tais como proteases do tipo subtilisina e tripsina.

Os dados obtidos indicam que a metodologia REMI pode ser empregada na busca de mutantes insercionais para determinantes de virulência em *M. anisopliae*

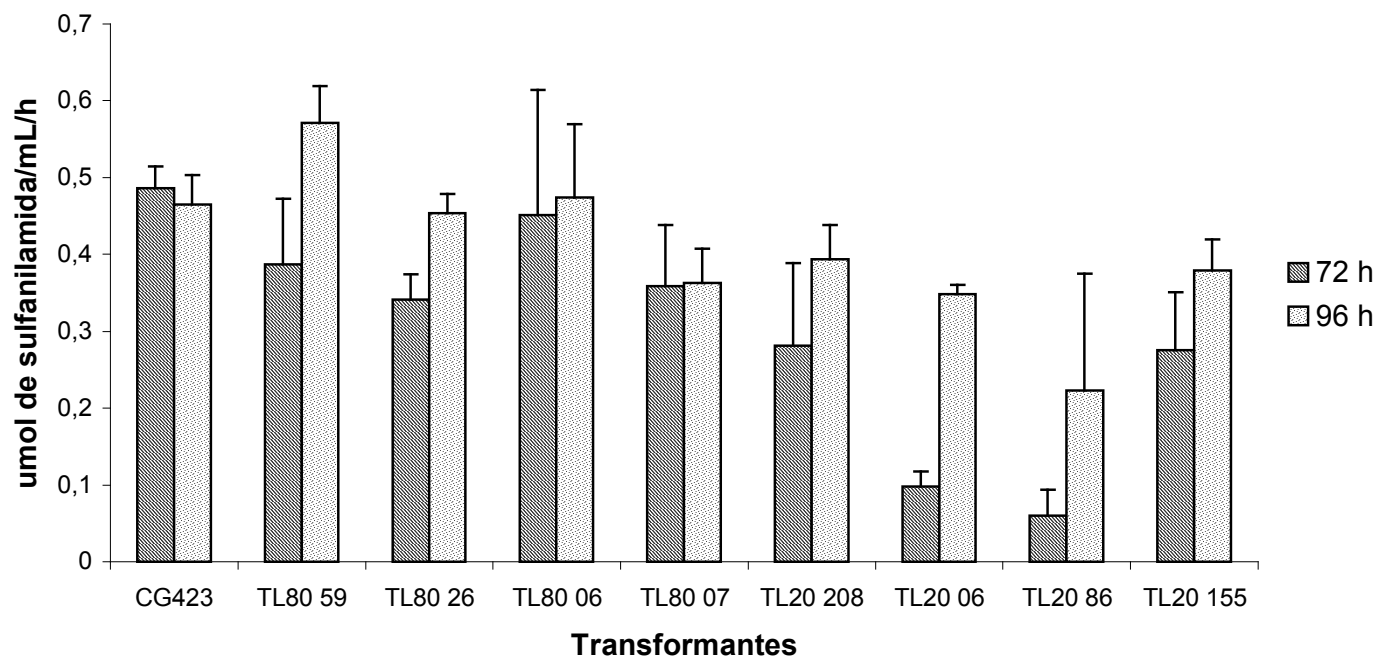
var. *acidum*, permitindo posterior análise de genes relacionados a estes determinantes a partir dos mutantes obtidos.

**Tabela 5.** Atividade proteolítica no sobrenadante de cultivo da linhagem selvagem (CG423) e transformantes, após 72 e 96 horas de incubação.

Linhagens	Atividade proteolítica*	
	72 horas	96 horas
CG423	0,48±0,02	0,46±0,03
TL20 06	0,09±0,01a	0,34±0,01a
TL20 86	0,06±0,03a	0,22±0,15
TL20 155	0,27±0,07a	0,37±0,03a
TL20 208	0,28±0,10a	0,39±0,04a
TL80 06	0,38±0,08	0,47±0,09
TL80 07	0,35±0,07a	0,36±0,04
TL80 26	0,52±0,05a	0,45±0,02
TL80 59	0,48±0,02a	0,57±0,04

\* Valores expressos em  $\mu\text{mol}$  de sulfanilamida/mL/h  $\pm$  desvio padrão da média. Médias seguidas da letra **a** são significativamente diferentes da linhagem CG423 (Teste t pareado,  $P < 0.05$ ).





**Figura 5.** Atividade proteolítica sobre o substrato natural azocaseína da linhagem CG423 e transformantes. Os valores estão expressos em  $\mu\text{mol}$  de sulfanilamida/mL/h. Os resultados representam a média de três experimentos.

## 5. Conclusões

- A metodologia de REMI foi efetiva na obtenção de transformantes da linhagem CG423 de *M. anisopliae* var. *acridum*.
- Altas concentrações de endonuclease de restrição, no sistema de transformação, reduz a eficiência de transformação da linhagem CG423.
- Alta estabilidade mitótica pôde ser observada para transformantes obtidos de cada uma das condições de transformação empregadas.
- Tanto a metodologia de protoplasto-PEG quanto de REMI permitiu a obtenção de transformantes de *M. anisopliae* var. *acridum* com alta resistência ao fungicida benomil.
- A porcentagem de transformantes cuja integração do vetor foi confirmada variou com o método de transformação empregado.
- O emprego de REMI permitiu a obtenção de transformantes de *M. anisopliae* var. *acridum* com atividade proteolítica reduzida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMATSU, H.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. AAL- Toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology**, v. 87, p. 976-972, 1997.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, 2° edição, 1998.

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.

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.

AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos de controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J.L. (coord.) **Genética de Microorganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracicaba: FEALQ, p. 111-114, 1985.

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.

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.

BÖLKER, M.; BÖHNERT, H.; BRAUN, K.H.; GÖRL, J.; KAHMANN, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Molecular Genetics**, v. 248, p. 547-552, 1995.

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 anisoplae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 142, p. 123-127, 1996.

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

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

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.

CHARNLEY, A.K.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

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.

CHURCHILL, A. C. L.; CIUFFETTI, L. M.; HANSEN, D. R.; VAN ETEN, H. D.; VAN ALFEN, N. K. Transformation of the fungal pathogen *Cryphonectria parasitica* with a variety of heterologous plasmids. **Current Genetics**, v. 17, p. 25-31, 1990.

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.; 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.

CUMMINGS, W.; CELERIN, M.; CRODIAN, J.; BRUNIK, L.; ZOLAN, M. Insertion mutagenesis in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants. **Current Genetics**, v. 36, p. 371-382, 1999.

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.

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

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.

DUARTE, R. T. D. **Transformação genética do fungo *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (CG 423) via *Agrobacterium tumefaciens***. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

EPSTEIN, L.; LUSNAK, K.; KAUR, S. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 189-203, 1997.

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 dês Sciences**, v. 281, p.1781-1784, 1975.

FOTHERINGHAM, S.; HOLLOMAN, W.K. Pathways of Transformation in *Ustilago maydis* Determined by DNA Conformation. **Genetics**, v. 124, p. 833-843, 1990.

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.

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.

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.

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.

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 antimitotic 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.

GRANADO, J.D. et al. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. **Molecular and General Genetics**, v. 256, p. 28-36, 1997.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HEALE, J. B., ISAAC, J. E., CHANDLER, D. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. **Pesticide Science**, v.26, p.79-92,1989.

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.

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.

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.

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.

JOSHI, L., St LEGER, R. J., ROBERTS, D.W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1b) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display – RT – PCR. **Gene**, v.97, p.1-8, 1997.

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.

KADO, C.I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Science**, v. 10, p. 1-32, 1991.

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.

KIM, K. et al. Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 273-276, 2002.

KIM, S.; SONG, J.; CHOI, H.T. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 201-204, 2004.

KUSPA, A.; LOOMIS, W.F. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 89, p. 8803-8807, 1992.

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.

LECUONA, R., RIBA, G., CASSIER, P., CLEMENT, J. L. I. Alterations of insect epicuticular hydrocarbon during infection with *Beauveria Bassiana* or *B. brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.58, p.10-18, 1991.

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.

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.

LU, S.; LYNGHOLM, L.; YANG, G.; BRONSON, C.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. Tagged mutations at the *Tox1* of *Cochiliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 91, p. 12649-12653, 1994.

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.; 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.

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.

MILNER, R.J. *Metarhizium flavoviride* (F1985) as a promising mycoinsecticide for Australian acridids. **Memorial of Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 287-300, 1997.

MISHRA, N.C.; TATUM, E.L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora crassa*. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 11, p. 3875-3879, 1973.

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.

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.

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.

OAKLEY, B.R.  $\beta$ -tubulin: the microtubule organizer? **Trends in Cell Biology**, v. 2, p. 1-5, 1992.

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.

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., CLARKSON, J. M. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.109, p.323-328, 1993.

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.

PEBERDY, J.F. Fungal protoplast. **FEMS Microbiology Letters**, v. 38, p. 307-318, 1991.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMONS, L.M.; Mac DONALD, K.D.; BUFFON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953

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

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.

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.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, p. 187, 1988.

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.

SANCHEZ, O.; NAVARRO, R.E.; AGUIRRE, J. Increase transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration. **Molecular and General Genetics**, v. 258, p. 89-94, 1998.

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.

SATO, T.; YAEGASHI, K.; ISHII, S.; HIRANO, T.; KAJIWARA, S.; SHISHIDO, K.; ENEI, H. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 2346-2350, 1998.

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.

SHI, Z.; CHRISTIAN, D.; LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology**, v. 85, p. 329-333, 1995.

SMALL, C. L. N.; BIDOCHKA, M. J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 109, n. 3, p. 307-313, 2005.

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

St. LEGER, R. J., COOPER, R. M., CHARNLEY, A. K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.258, p.123-131, 1987b.

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.; 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, 1991.

St. LEGER, R. J., FRANK, D. C., ROBERTS, D. W., STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry**, v.204, p.991-1001, 1992.

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.; 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, 1996.

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.

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

SWEIGARD, J.A.; CARROL, A.M.; FARRAL, L.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular and Plant-Microbe Interaction**, v. 11, p. 404-412, 1998.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect Pathology**. San Diego, Academic Press, p.666, 1993.

THON, M.R.; NUCKLES, E.M.; VAILLANCOURT, L.J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular and Plant-Microorganisms Interaction**, v. 13, p. 1356-1365, 2000.

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.

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

TSUGE, T.; NISHIMURA, S.; KOBAYASHI, H. Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternate* mediated by the repetitive rDNA sequence. **Gene**, v. 90, p. 207-214, 1990.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAIISHI, 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.

TUNLID, A.; AHMAN, J.; OLIVER, R.P. Transformation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotryps oligospora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 111-116, 1999.

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.

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.

VICENTINI, S.; MAGALHÃES, B.P. Infection of the Grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the Entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 309-314, 1996.

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.

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.

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.

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.

Trabalho a ser submetido a revista Journal of Applied Microbiology

**Transformation and protease mutant isolation in *Metarhizium anisopliae* var *acridum* by restriction enzyme-mediated integration**

C.A.A. de Paula, A.C. Donatti, A.B.A. Laranjeira, M.H.P. Fungaro, and M.C. Furlaneto

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina-PR, Brazil.

Transformation of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* by REMI

**Correspondence** M.C. Furlaneto, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL P.O. Box 6001, Londrina -PR 86051-990, Brazil. Tel.: +55-43-33715736; Fax: +55-43-33714207; E-mail [furlaneto@uel.br](mailto:furlaneto@uel.br)

## ABSTRACT

**Aims:** To establish the restriction enzyme-mediated integration (REMI) method for *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a fungal pathogen of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Central Brazil and to screen mutants with altered protease production.

**Methods and Results:** Protoplasts of *M. anisopliae* var. *acridum* were successfully transformed using both the conventional protoplast-PEG and REMI methods. The number of transformants increased when low amounts of the restriction enzyme *Pst*I (20 U) was added, varying from 12.4 to 16.7 transformants  $\mu\text{g}^{-1}$  DNA. In presence of 80 U of *Pst*I transformation rate was decreased. Some 100% of the transformants tested were found to be mitotically stable and showed capacity of growing on increased concentrations of benomyl (up to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). PCR analysis with the plasmid-specific primers revealed that the percentage of transformants with integrated plasmid was 38%, 58%, 66% and 76% for transformants obtained from linear plasmid alone (TL0), and from REMI using 20, 40 and 80 U of *Pst*I, respectively. Three putative REMI-tagged mutants with a significantly lower protease production compared to the CG423 were identified after growth in the presence of grasshopper cuticle.

**Conclusions:** We efficiently transform protoplasts of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* by REMI method. The employment of this method allows the generation of mutants with altered protease production.

**Significance and Impact of the Study:** Considering the efficiency of REMI, this method may represent a useful tool for insertional mutagenesis in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, REMI, benomyl resistance.



## INTRODUCTION

*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* is recognized as a highly specific and virulent pathogen of orthopteran insects, e.g., grasshoppers (Inglis *et al.* 2001) which can be devastating pest of crops and pasture in many parts of the world. 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 such as *Metarhizium anisopliae* penetrate host cuticle with the aid of a battery of extracellular cuticle-degrading enzymes (Charnley and St. Leger 1991). Proteases are involved at degrading of insect cuticle proteins, assisting penetration and providing nutrients for further growth. 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).

Identification of pathogenicity genes in entomopathogenic fungi could facilitate selection and development of improved biocontrol strains. 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).

Genetic transformation has been an important tool in molecular biology of *M. anisopliae* aiming at its improvement as biocontrol agent (St Leger *et al.* 1996). A transformation method known as restriction-enzyme-mediated integration (REMI) can be used to generate random insertional mutations and has been used in

investigations of complex biological processes such as pathogenicity in fungal systems (reviewed in Mullins and Kang 2001)

REMI, a method for generating nonhomologous integration of transforming DNA into the chromosomes is a result of the cleavage of chromosomal DNA by the introduced enzyme, followed by pairing of the cohesive ends between the linear plasmid and the cleaved chromosomal DNA (Schiestl and Petes 1991). Since REMI was described in yeast (Schiestl and Petes 1991), this method has been used as a genetic tool to generate mutations and tag genes involved in many different kinds of mutants (Redman and Rodriguez 1994; Bolker *et al.* 1995; Leem *et al.* 2003; Kim *et al.* 2002, 2004; Rogers *et al.* 2004; Seong *et al.* 2005).

In this paper, we report a successfully procedure for the REMI transformation of *M. anisopliae* var. *acridum*. Mitotic stability and resistance levels of the transformants were assessed. 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*.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal strain and plasmid

The *M. anisopliae* var. *acridum* strain CG423 was obtained from the Cenargen/Embrapa collection of entomopathogenic fungi (Cenargen, Brasília/DF - Brazil). Fungal transformation vector pBT6 (Orbach *et al.* 1986) containing the structural  $\beta$ -tubulin gene (*bml*) from a benomyl-resistant strain of *Neurospora crassa*, was propagated in *E. coli* strain TOP10 and purified as described by Sambrook and Russel (2001).

### Protoplast transformation

Protoplasts generation and transformation was carried out as previously described (Furlaneto *et al.* 1999) with modifications. Production of protoplasts was carried out in buffer (0.7 mol l<sup>-1</sup> KCl, 200 mmol l<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 5.8) containing 5.0 mg ml<sup>-1</sup> of Lysing enzyme (Sigma, St. Louis, MO). Protoplasts were finally resuspended in STC buffer (0.7 mol l<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>) at a concentration of 1 x 10<sup>8</sup> ml<sup>-1</sup>. Plasmid pBT6 was linearized with *Pst*I restriction endonuclease as described by Sambrook and Russel (2001), followed by heat inactivation at 70°C for 20 min.

In a conventional PEG method, 10  $\mu$ g of either circular or linear pBT6 DNA was added to a 100  $\mu$ l aliquot of protoplast suspension. Each REMI transformation used 10  $\mu$ g of linear pBT6 DNA and 20, 40 or 80 U of restriction enzyme. After 20 min incubation on ice, 12.5  $\mu$ l of polyethylene glycol (PEG) solution (25% PEG 6000 in 50 mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7.5) was added and the mixture was

incubated on ice for 20 min. To the mixture, 300  $\mu\text{l}$  of PEG solution was added, mixed gently, and incubated for 15 min at room temperature. The transformation mix was diluted with 500  $\mu\text{l}$  STC buffer, centrifuged at 1500g for 20 min, and the protoplasts were suspended in 300  $\mu\text{l}$  of an osmoprotectant buffer (0.5 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 200 mmol  $\text{l}^{-1}$  phosphate buffer, pH 5.8). 100  $\mu\text{l}$  of transformed protoplast suspension was spread over CM agar medium containing the same osmoprotectant buffer and incubated at 28°C for 48 h. The plates were then overlaid with CM medium containing benomyl at 13  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Individual transformants that appeared on the plates were purified by subculturing on CM agar medium (Pontecorvo *et al.* 1953) containing 13  $\mu\text{g ml}^{-1}$  benomyl.

### **Mitotic stability and resistance analysis**

Mitotic stability of the integrated plasmid vector was assessed by successively culturing of 75 putative transformants obtained from each transformation condition on CM agar medium for five generations in the absence of benomyl, after which transformants were transferred to CM containing benomyl (13  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The resistance analysis of putative transformants was tested after subculturing on CM agar medium containing benomyl at different concentrations (13, 25, 50 and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Plates were incubated at 28°C for 7 days.

### **DNA isolation and molecular analysis**

For genomic DNA isolation, conidia from wild-type CG423 strain and transformants were inoculated into CM agar medium containing benomyl (13  $\mu\text{g ml}^{-1}$

<sup>1</sup>) and incubated in an orbital shaker at 180 rpm for 24 h at 28 °C. The resulting mycelium was harvested by filtration on Whatman No. 1 filter paper and washed several times with sterile water and resuspended in 500 µl breaking buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA) and 500 µl of deproteinizing mixture (50% phenol, 48% chloroform, 2% isoamyl alcohol) along with 6 glass beads (2000 microns). The suspension was vortexed at maximum speed for 2 min. The DNA from the aqueous phase was precipitated by adding two volumes of ice-cold ethanol. The precipitate was collected by centrifugation (12000g/10 min), washed with 70% ethanol and air dried. The pellet was resuspended in 15 µl of milliQ water.

PCR analysis of 50 putative transformants obtained from each transformation (REMI and conventional PEG method) was performed using the primer pair *Amp1* (5'-GTCCTGCAACTTTATCCG -3') and *Amp2* (5'-GGTATTATCCCGTATTGAC -3'). The reaction had a final volume of 20 µl containing 25 pmol l<sup>-1</sup> each of the four dNTPs, 20 pmol l<sup>-1</sup> of each primer, and 10 ng of extracted DNA and 1 unit of Taq DNA polymerase (CENBIOT) with appropriate reaction buffer. All amplifications were performed in a thermocycler (Eppendorf, Mastercycler gradient) programmed to an initial denaturing cycle of 7 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1.5 min. Amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

### **Protease assay**

Transformants were initially screened for protease production on agar plates containing minimal medium (MM) (Pontecorvo *et al.* 1953) lacking nitrogen source amended with 0.2% (w/v) skimmed milk. Conidia from CG423 and transformants were point-inoculated onto solid media following incubation at 28°C for 48 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 as described by St. Leger *et al.* (1997). Protease activity were also detected in culture supernatants from CG423 and transformants with altered protease secretion by harvesting conidia from sporulated cultures grown on agar plates composed of MM supplemented with 0.5% (w/v) *R. schistocercoides* cuticle (MM+cut), prepared from adult insects using an aqueous solution of 1 % (w/v) potassium tetraborate (Andersen 1980). For enzyme production conidia were inoculated into 10 ml of liquid MM+cut at a concentration of  $5 \times 10^6$  conidia ml<sup>-1</sup> and grown in submerged culture (180 rpm) at 28°C for 72 and 96 h. Following growth, mycelium was harvested by centrifugation at 8000g for 15 min. The supernatants (extracellular fraction) obtained 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 that were performed in duplicate.

## RESULTS

### Restriction enzyme-mediated integration (REMI) transformation of *M.*

#### *anisopliae* var. *acidum*

The amount of restriction enzyme has been reported to affect the outcome of REMI transformation (Shi *et al.* 1995; Granado *et al.* 1997; Sato *et al.* 1998; Thon *et al.* 2000). We tested the effect of this variable on the transformation efficiency of *M. anisopliae* var. *acidum* with plasmid pBT6, which confers benomyl resistance. Plasmid pBT6 (Orbach *et al.* 1986) has a single restriction site for *Pst*I located in region that is not essential for vector function and can therefore be used for REMI.

Protoplast viability was assessed for each experiment and was found to be ca. 8% in both presence and absence of polyethylene glycol (PEG). For selection of resistant colonies in transformation experiments, 13.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  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 15-20 days. Spontaneous benomyl-resistant colonies were not observed in control plates, which were spread with protoplasts from experiments with no plasmid.

As shown in Table 1 the plasmid form (circular or linear) employed and the amount of restriction enzyme affect the transformation yield. PEG- $\text{CaCl}_2$  mediated transformation of *M. anisopliae* var. *acidum* protoplasts with closed-circular and linear pBT6 yielded ca. 8.5 and ca. 12 benomyl resistant transformants  $\mu\text{g}^{-1}$  DNA, respectively. The number of transformants increased when low amounts of restriction enzyme were used. There was a ca. 1.2-fold increase in the number of

transformants using 20 U *Pst*I. Furthermore, at higher concentration of enzyme (80 U *Pst*I) transformation rate dropped to a ca. 1.6-fold. Other colonies apparently resistant to benomyl but not able to replicate after subculturing in selective medium (“abortive” transformants) were also observed (data not shown).

### **Stability and resistance levels of transformants**

Some 100% of putative transformants tested remained mitotically stable after five rounds of growth on non-selective medium (with no benomyl added). In addition, variation in colony morphology and growth rate was observed among various independent transformants (data not shown). Furthermore, the transformants of *M. anisopliae* var. *acridum* were capable of growing on increased concentrations of benomyl (up to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### **Molecular analysis of transformants**

The chromosomal DNAs of 50 stable randomly selected transformants obtained from each transformation condition were used as template for the PCR using *Amp*-specific primers (*Amp1* and *Amp2*) in order to confirm the integration of the plasmid into the host genome. The percentage of transformants which integration of plasmid was confirmed varied with the transformation method employed. An expected amplicon of approximately 418 bp was observed for 38%, 58%, 66% and 76% of the transformants obtained from non-REMI (linear plasmid alone), and from REMI using 20, 40 and 80 U of *Pst*I, respectively. Figure 1 show 16 transformants which integration of the vector was confirmed by PCR.



### **Protease assay of transformants**

A total of 74 transformants (31 TL20 and 43 TL80) with confirmed integration of the plasmid DNA was screened for altered protease production on agar plates containing skimmed milk as the sole nitrogen source. Some 27 transformants had lower protease secretion than the wild-type CG423 (Table 2). A total of seven mutants (TL20 06, 86, 155, 208 and TL80 06, 07, 59) showing similar growth rate (diameter colony) compared to that of the wild-type strain and with altered protease secretion were further tested for protease production after growth in the presence of grasshopper cuticle. Three putative REMI-tagged mutant had a significantly (Parwise t-Test) lower protease production compared to the CG423 (Table 3). Two transformants TL20 86 and TL80 07 showed lower protease production after 72 h growth on MM+cut compared to the CG423 (data not shown).

### **DISCUSSION**

REMI is a method for generating nonhomologous end-joining integration (Thode *et al.* 1990) and has been very useful to generate many kinds of mutations by the integration of the transforming vectors (Riggle and Kumamoto 1998).

This work describes the first application of REMI to the biocontrol agent *M. anisopliae* var. *acidum* and provides pre-requisite steps for the identification of pathogenicity genes involved in grasshopper biocontrol.

Previous experience with non-REMI transformation of *M. anisopliae* var. *acidum* indicated that the protocol adopted in the present study could be more

efficient in transformation yield than similar protocols using different PEG concentration and incubation period before selection of resistant colonies (Furlaneto *et al.* 1999). These authors obtained up to 3.6 transformants per  $\mu\text{g}$  closed-circular plasmid DNA per  $10^7$  protoplasts.

Circular plasmid seems to be less efficient substrate for integration in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* compared to linear plasmid (Table 1). Similar result was detected for other fungal species (Shi *et al.* 1995; Sato *et al.* 1998). This result suggests that linear plasmid DNA integrates more readily into the fungal genome than circular DNA.

In REMI transformation the effect of *Pst*I in transformation yield was highest when 20 units of enzyme were added to the transformation mixture. Increasing amounts of *Pst*I decreased the number of transformants recovered (Table 1). It is possible that transformation with high concentration of restriction enzyme produces damage as well as integration events. Similar result was previously described by other fungal species (Shi *et al.* 1995; Sato *et al.* 1998; Irie *et al.* 2001; Rogers *et al.* 2004). Furthermore, a systematic study with *Magnaporthe grisea* suggested that effects on transformation efficiencies are very much dependent on enzyme concentration (Shi and Leung 1995).

In our study, PCR analysis with the plasmid-specific primers (*Amp1* and *Amp2*) was employed in order to detect the integration of the plasmid DNA into the fungal genome. Non-REMI method resulted in lower percentage of transformants (38%) which integration of the plasmid vector was confirmed. On the other hand, in REMI transformation using 40 and 80 units of restriction enzyme led to the highest

percentage of transformants with integrated vector. The relation between high amounts of *Pst*I during the transformation and the increase in percentage of transformants which plasmid integration occurred may suggest the occurrence of nonhomologous integration of transforming DNA into the chromosomes which is a feature of REMI method (Riggle and Kumamoto 1998). All the remaining transformants tested proved to be mitotically stable after five rounds of growth on non-selective medium and were capable of growing on  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  benomyl (ca. 15-fold the minimal inhibitory concentration of the untransformed strain). For these transformants the absence of the plasmid-specific amplicon may be due to the occurrence of gene replacement. Cooley *et al.* (1993) reported high level of homology among fungal  $\beta$ -tubulin genes. Furthermore, in previous non-REMI transformation of *M. anisopliae* with *N. crassa* benomyl resistance gene (*bml*) it has been reported that the DNA preferentially integrated at homologous sites by gene replacement, e.g. by homologous gene replacement of the  $\beta$ -tubulin allele (Bogo *et al.* 1996; Valadares-Inglis and Inglis 1997). The former authors described that 60% of the *M. anisopliae* transformants were generated by gene conversion.

One of the advantages of transformation by REMI is generation of various mutants, which can be used in the cloning of the genes related in the mutant characteristics (Riggle and Kumamoto 1988). Proteases produced by entomopathogenic fungi play an important role in cuticle penetration during pathogenesis (St Leger 1995) and *M. anisopliae* var. *acidum* is believed to produce many proteases isoforms (Freimoser *et al.* 2003; Bagga *et al.* 2004).

REMI transformants with integrated plasmid DNA were initially screened for altered protease production on casein agar plates. Transformants with absence of a clearing zone around the colony or reduced protease secretion compared to the wild-type were obtained (Table 2). Protease activity was also analysed in culture supernatants from CG423 and mutants (TL20 06, 86, 155, 208 and TL80 06, 07, 59) showing reduced protease secretion. As shown in Table 3 we obtained three putative REMI-tagged mutants with reduced protease production after growth in basal minimal medium containing *R. schistocercoides* cuticle (MM+cut) as the sole nitrogen source. In order to identify gene(s) which were implicated in proteases production by *M. anisopliae* var. *acidum*, transformants TL20 06, TL20 155 and TL20 208 were selected for further studies.

By the employment of REMI method many pathogenicity mutants have been reported in plant pathogenic fungi such as *Ustilago maydis* (Bölker *et al.* 1995), *Colletotrichum graminicola* (Thon *et al.* 2000), *Colletotrichum magna* (Redman *et al.* 1999), *Fusarium graminearum* (Seong *et al.* 2005) and in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Cantone and Vandenberg 1999).

Considering the efficiency of the REMI transformation protocol, this appears to be an efficient tool in characterising virulence genes of *M. anisopliae* var. *acidum* because the mutation of interest is physically marked, providing a means to isolate and analyze DNA flanking the site of the insertion.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and PROPPG/UEL - Brazil. C.A.A.P.

and A.C.D. are fellowship-holders of CAPES-Brazil. The authors thank Dr. Albert Leyva for reading the manuscript.

## REFERENCES

- Andersen, S.O. (1980) Cuticular sclerotization. In *Cuticle Techniques in Arthropods*. ed. Miller, T.A. pp. 185-217. Springer-Verlag, New York.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S.E. and St. Leger, R.J. (2004) Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **324**, 159-169.
- Bogo, M.R., Vainstein, M.H., Aragao, F.J.L., Rech, E. and Schrank, A. (1996) High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 123-127.
- Bölker, M., Böhnert, H., Braun, K.H., Görl, J. and Kahmann, R. (1995) Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- Cantone, F.A. and Vandenberg, J.D. (1999) genetic transformation and mutagenesis of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *J Inv Pathol* **74**, 281-288.
- Charnley, A.K. and St. Leger, R.J. (1991) The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* ed. Cole, G.T. and Hoch, H.C. pp. 267-287. Plenum, London.

- Cooley, R.N. and Caten, C.E. (1993) Molecular analysis of the *Septoria nodorum*  $\beta$ -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. *Mol Gen Genet* **237**, 58-63.
- 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.
- 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.
- Granado, J.D., Kertesz-Chaloupková, K., Aebi, M. and Kües, U. (1997) Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genet* **256**, 28-36.
- 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.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents* ed. Butt, T.M., Jackson C. and Magan, N. pp. 23-69. CAB International, Wallingford.

- Irie, T., Honda, Y., Hirano, T., Sato, T., Enei, H., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2001) Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using lentinus edodes GPD expression signals. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 707-709.
- Kim, K., Leem, Y., Kim, K., Kim, K. and Choi, H.T. (2002) Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 273-276.
- Kim, S., Song, J. and Choi, H.T. (2004) Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration. *FEMS Microbiol Lett* **233**, 201-204.
- Leem, Y.E.L., Ross, I.K. and Choi, H.T. (2003) Tagging and localization of a phospholipase D gene in *Coprinellus congregatus* by restriction enzyme-mediated integration and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 285-289.
- Magalhães, B.P. (1997) Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In *Progress in Microbial Ecology* ed. Martins, M.T., Sato, M.I.Z., Tiedje, J.M., Hagler, L.C.N., Dobereiner, J. and Sanchez, P.S. pp. 429-433. Santos: Brazilian Society for Microbiology/ICOME.
- Mullins, E.D. and Kang, S. (2001) Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol Life Sci* **58**, 2043-2052.

- Orbach, M.J., Porro, E.B. and Yanofsky, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for  $\beta$  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.
- Redman, R.S. and Rogrigues, R.J. (1994) Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Exp Mycol* **18**, 230-246.
- Redman, R.S., ranson, J.C. and Rogrigues, R.J. (1999) Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a non-pathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 969-975.
- Riggle, P.J. and Kumamoto, C.A. (1998) Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme mediated integration. *Curr Opin Microbiol* **1**, 395-399.
- Rogers, C.W., Challen, M.P., Green, J.R. and Whipps, J.M. (2004) Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 207-214.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.



- Sato, T., Yaegashi, K., Ishii, S., Hirano, T., Kajiwara, S., Shishido, K. and Enei, H. (1998) Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 2346-2350.
- Schiestl, R.H. and Petes, T.D. (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7585-7589.
- Seong, K., Hou, Z., Tracy, M., Kistler, H.C. and Xu, J.R. (2005) Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* **95**, 744-750.
- Shi, Z. and Leung, H. (1995) Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**, 949-959.
- Shi, Z., Christian, D. and Leung, H. (1995) Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathology* **85**, 329-333.
- St Leger, R.J. (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can J Bot* **73**, S1119-S1125 (Suppl. 1).
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6349-6354.

- St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D.W. (1997) Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**, 1983-1992.
- Thode, S., Schafer, A., Pfeiffer, P. and Vielmetter, W. (1990) A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell* **60**, 921-928.
- Thon, M.R., Nuckles, E.M. and Vaillancourt, L.J. (2000) Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 1356-1365.
- 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.
- 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**

Transformation efficiency of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* using a conventional PEG method and REMI

Transformation condition	Number of Ben <sup>R</sup> colonies obtained $\mu\text{g}^{-1}$ DNA <sup>b</sup>
Circular plasmid alone	$8.5 \pm 1.15$
Linear plasmid alone	$11.9 \pm 0.82$
REMI 20 <sup>a</sup>	$14.8 \pm 2.22$
REMI 40 <sup>a</sup>	$11.9 \pm 0.35$
REMI 80 <sup>a</sup>	$9.3 \pm 1.56$

<sup>a</sup> units of enzyme (*Pst*I) per transformation.

<sup>b</sup> each result is the mean of three independent experiment  $\pm$  standard error of the mean.

**Table 2** Protease secretion by *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* CG423 and REMI transformants on agar plates containing skimmed milk as the sole nitrogen source.

Strain	Protease activity <sup>a</sup>	Strain	Protease activity <sup>a</sup>
CG423	2.94 ± 0.6	TL80 24	1.3 ± 0.2
TL20 06	1.6 ± 0.24	TL80 36	1 ± 0
TL20 15	1.27 ± 0.2	TL80 45	1 ± 0
TL20 57	1.5 ± 0.4	TL80 57	1 ± 0
TL20 86	1 ± 0	TL80 59	1 ± 0
TL20 155	1 ± 0	TL80 77	1 ± 0
TL20 208	1 ± 0	TL80 118	1 ± 0
TL80 02	1 ± 0	TL80 122	1 ± 0
TL80 04	1 ± 0	TL80 132	1 ± 0
TL80 06	1 ± 0	TL80 139	1 ± 0
TL80 07	1 ± 0	TL80 140	1.47 ± 0.18
TL80 13	1 ± 0	TL80 151	1 ± 0
TL80 19	1 ± 0	TL80 153	1.42 ± 0.14
TL80 21	1 ± 0	TL80 182	1.47 ± 0.16

<sup>a</sup> each result is the mean of three independent experiment ± standard error of the mean and represent the protease activity expressed as the ratio between the total diameter of the colony plus the zone of clearing around it and that of the colony.

Values  $> 1.0$  indicate that the strain is releasing the enzyme into the medium.

Values  $= 1.0$  indicate the absence of clearing zone around the colony.

**Table 3** Protease activity in culture supernatants from CG423 and REMI transformants of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* after growth on minimal medium supplemented with cuticle from *Rhammatocerus schistocercoides* (0.5%)

Strain	Protease activity <sup>a*</sup>	
	72 h	96 h
CG423	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.03
TL20 06	0.09 ± 0.01	0.34 ± 0.01
TL20 155	0.27 ± 0.07	0.37 ± 0.03
TL20 208	0.28 ± 0.10	0.39 ± 0.04

<sup>a</sup> Protease activity expressed as  $\mu\text{mol}$  sulfanilamide/ml/h. Each result is the mean of three replicates presented plus or minus the standard error. \* Parwise t-Test ( $P < 0.05$ ) revealed significant differences between CG423 and transformants.

**Figure legend**

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) of *M. anisopliae var. acridum* wild-type and REMI transformants using the *Amp*-specific primers. Lane 1, pBT6 plasmid DNA; Line 2, *M. anisopliae var. acridum* wild-type; lines 3-6 benomyl-resistant transformants obtained with linear pBT6 alone; lines 7-10, benomyl-resistant transformants obtained with linear pBT6 plus 20 U of *Pst*I; lines 11-14, benomyl-resistant transformants obtained with linear pBT6 plus 40 U of *Pst*I; lines 15-18, benomyl-resistant transformants obtained with linear pBT6 plus 80 U of *Pst*I. M, DNA molecular size markers (bp) is indicated.

Figure 1

