

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FUNCIONAL DAS
 β -N-ACETILGLICOSAMINIDASES DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

EDER SILVA DE OLIVEIRA

Porto Alegre, 2016.

EDER SILVA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E FUNCIONAL DAS
 β -N-ACETILGLICOSAMINIDASES DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*:

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

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Co-orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, agosto de 2016.

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

Para Pâmela

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Augusto Schrank pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança e incentivo durante todos esses anos. Levarei comigo seu exemplo como professor, pesquisador e entusiasta da ciência.

Agradeço ao meu co-orientador Charley Staats pelo apoio e ajuda durante toda minha formação acadêmica. Muito obrigado pelos anos de convivência e aprendizagem.

À Professora Marilene Vainstein pela orientação durante meus anos de IC e mestrado e por todos os ensinamentos durante minha formação acadêmica. Muito obrigado pela oportunidade de iniciar minha formação em seu laboratório.

Serei sempre grato à minha querida colega Ângela Junges. Toda minha admiração e gratidão por sua amizade, altruísmo e competência. Sua ajuda foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Agradeço ao meu colega Nicolau Sbaraini por sua amizade, ideias, contribuições e troca de ensinamentos durante todo esse período.

A todos meus queridos amigos que fiz ao longo dos dez anos que estive no Centro de Biotecnologia, amigos que fazem parte de minha história e que vou levar para toda a vida.

Agradeço à minha família que sempre me deu o apoio necessário para seguir meu caminho e alcançar meus objetivos, em especial à minha Mãe.

Meu eterno agradecimento à minha esposa, Pâmela. Não teria conseguido sem você. Obrigado por todo seu amor.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FUNGO FILAMENTOSO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	19
2.2. PROCESSO DE INFECÇÃO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i>	22
2.3. ESTUDOS GENÔMICOS EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	24
2.4. QUITINA NA PAREDE CELULAR FÚNGICA E NO EXOESQUELETO DE ARTRÓPODES.....	27
2.5. SISTEMA QUITINOLITICO: QUITINASES E β -N-ACETIL-GLICOSAMINIDASES (NAGases).....	29
2.6. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA N-ACETIL-D-GLICOSAMINA (GlcNAc).....	32
2.7. QUITINASES	35
2.8. β -N-ACETILGLICOSAMINIDASES (NAGases).....	38
2.8.1. NAGases da família GH84.....	40
2.8.2. NAGases da família GH3.....	40
2.8.3. NAGases da família GH20.....	42
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. OBJETIVO GERAL	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4. CAPÍTULO I: Molecular evolution and transcriptional profile of GH3 and GH20 β -N-acetylglucosaminidases in the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
5. CAPÍTULO II: Análise funcional dos genes de β -N-acetilglicosaminidases das famílias GH20 e GH3 em <i>Metarhizium anisopliae</i>	106
5.1. INTRODUÇÃO	107

5.2.	MATERIAL E MÉTODOS	110
5.2.1.	Material biológico	110
5.2.2.	Meios de cultivo e manutenção dos organismos	110
5.2.3.	Construção de cassetes para deleção das NAGases	111
5.2.4.	Transformação de <i>M. anisopliae</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> (ATMT)	115
5.2.5.	Busca por mutantes nulos dentre as colônias transformantes.....	115
5.3.	RESULTADOS.....	116
5.3.1.	Construção de vetores para produzir mutantes nulos para os genes de NAGases..	116
5.3.2.	Transformação de <i>M. anisopliae</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> (ATMT)	120
5.3.3.	Identificação de mutantes nulos nas colônias transformantes.....	120
5.4.	DISCUSSÃO.....	122
6.	CONCLUSÕES.....	125
7.	PERSPECTIVAS	128
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	ANEXO I – <i>Curriculum Vitae</i>	144

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

° C	graus Celsius
%	por cento
ANOVA	Análise de Variância
ATMT	transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>bar</i>	gene que confere resistência a glifosinato de amônio
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CAZY	<i>Carbohydrate-Active enZymes Database</i>
C-terminal	carboxi-terminal
d	dias
DNA	ácido desoxiriboucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
EDTA	sal dissódico do ácido etileno-diamino-tetracético
ENGase	endo-N-acetil-glicosaminidase
<i>g</i>	força gravitacional
g	grama
GH	glicosil hidrolase
GH18	glicosil hidrolase da família 18
GH20	glicosil hidrolase da família 20
GH3	glicosil hidrolase da família 3
GH84	glicosil hidrolase da família 84
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
MC	meio de Cove
MCc	meio de Cove completo
mg	miligrama
mg	micrograma

mg/mL	miligrama por mililitro
µg/mL	micrograma por microlitro
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mM	mili Molar
MM	meio mínimo
mm	micrômetro
mmol	micro Molar
mRNA	RNA mensageiro
N- terminal	amino-terminal
NAGase	β-N-acetil-glicosaminidase
NHEJ	união terminal não-homóloga (<i>non-homologous endjoining</i>)
nt	nucleotídeo
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura)
p/v	peso por volume
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial de hidrogênio
pI	ponto isoelétrico
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (reação quantitativa em cadeia da polimerase após transcrição reversa)
s	segundo
T-DNA	DNA de transferência
TE	tampão Tris-EDTA
v/v	volume por volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA INTRODUÇÃO

Figura 1. O espectro de hospedeiros de <i>M. anisopliae</i> inclui pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas.	20
Figura 2. Aspectos morfológicos de <i>M. anisopliae</i>	21
Figura 3. Ciclo de infecção de <i>M. anisopliae</i> demonstrando os tipos celulares diferenciados conforme as etapas de infecção sobre o carrapato bovino <i>R. microplus</i>	23
Figura 4. Relações filogenéticas de fungos entomopatogênicos com outros fungos.	26
Figura 5. Molécula de quitina.	29
Figura 6. Representação esquemática dos principais padrões de clivagens de enzimas quitinolíticas.	31
Figura 7. Vias catabólicas e anabólicas da quitina em fungos filamentosos.	33
Figura 8. Mecanismos catalíticos das NAGases das famílias GH20, GH84 e GH3.	39

FIGURAS DO CAPÍTULO I

Figure 1. Modular domain structure from <i>M. anisopliae</i> NAGase genes.	79
Figure 2. Phylogenetic relationships among GH20 NAGases from filamentous fungi.	80
Figure 3. Phylogenetic relationships among GH3 NAGases from bacteria, zygomycete, filamentous fungi and <i>M. anisopliae</i> β -glucosidases.	81
Figure 4. Relative expression of GH20 and GH3 NAGase genes in <i>M. anisopliae</i> , considering MCc as reference condition.	82
Figure S1. Multiple alignment of GH20 NAGases from filamentous fungi.	85-88
Figure S2. Multiple alignment of GH3 NAGases from bacteria, zygomycete, filamentous fungi, and <i>M. anisopliae</i> β -glucosidases.	89-100
Figure S3. Major <i>Metarhizium anisopliae</i> cell types involved in infection cycle and analyzed in this work.	101

FIGURAS DO CAPÍTULO II

- Figura 9.** Representação esquemática da construção dos *cassettes* para deleção dos genes de NAGases em *M. anisopliae*. 112
- Figura 10.** Confirmação da construção dos *cassettes* de deleção Δ MaNAG1, Δ MaNAG2, Δ MaNAG3 e Δ MaNAG4. 117
- Figura 11.** Confirmação da construção dos vetores pPZP:: Δ NAG1, pPZP:: Δ NAG2, pPZP:: Δ NAG3 e pPZP:: Δ NAG4..... 114-119
- Figura 12.** Primeira etapa da detecção de mutantes para os genes MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4. 121

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO CAPÍTULO I

Table 1. List of microorganisms with <i>M. anisopliae</i> NAGases ortologs used in phylogenetic analysis.	83
Table 2. Properties of <i>Metarhizium anisopliae</i> GH20 and GH3 β -N-acetylglucosaminidases.	84
Table S1. Primer sequences used in qPCR experiment, targeting <i>M. anisopliae</i> GH20 and GH3 NAGase genes and reference gene.	101

TABELAS DO CAPÍTULO II

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores de deleção dos genes de NAGases de <i>M. anisopliae</i>	113
Tabela 2. Número de potenciais mutantes nulos de <i>M. anisopliae</i> E6 dentre os transformantes obtidos por ATMT.	121

RESUMO

A degradação de quitina é importante para o remodelamento da parede celular em fungos filamentosos e crucial para o rompimento da cutícula de hospedeiros artrópodes durante a infecção de fungos entomopatogênicos. Além disso a quitina é uma importante fonte nutricional. Para que a quitina possa ser eficientemente utilizada, a atividade de β -N-acetilglicosaminidases (NAGases) deve estar presente. Após a ação de quitinases sobre a quitina, gerando dímeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc)₂, NAGases hidrolisam suas ligações β -1-4 produzindo GlcNAc livre. Fungos filamentosos possuem, em média, 15 a 25 quitinases, mas somente duas NAGases, o que leva a questões sobre a real importância destas enzimas. Em escala genômica, foram identificadas no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* duas NAGases da família GH20 (MaNAG1 e MaNAG2) e duas NAGases da família GH3 (MaNAG3 e MaNAG4) das glicosil hidrolases. Análises filogenéticas sugerem subseqüentes duplicações ocorrendo principalmente no clado de MaNAG2, resultando na presença de ortólogos em um amplo espectro de ascomicetos com diferentes estilos de vida. MaNAG1 agrupou majoritariamente com espécies entomopatogênicas. MaNAG3 e MaNAG4 apresentaram alta similaridade de sequências e conservação de domínios com NAGases GH3 de bactérias. O perfil transcricional dos genes das NAGases GH20 e GH3 foi avaliado por qPCR, em oito diferentes condições de cultivo, representando diferentes estágios de desenvolvimento ou diferentes estados nutricionais. As NAGases apresentaram perfis de transcrição diferenciais em resposta às diferentes condições, indicando a ausência de um padrão de regulação gênica em comum. Os perfis de expressão variáveis também sugerem que elas não devem possuir funções totalmente redundantes. Ensaio de transcrição relativa mostraram a indução da expressão de MaNAG1, MaNAG2 e MaNAG4 por quitina 1%, enquanto MaNAG3 foi induzida em meio suplementado com GlcNAc 0,25%. As relações evolutivas de MaNAG3 e MaNAG4 e a regulação de suas expressões por substratos quitinosos são a primeira evidência do envolvimento de NAGases GH3 em processos celulares fisiológicos em ascomicetos, apontando para sua potencial relevância na diferenciação celular durante o ciclo de vida de *M. anisopliae*. Com o objetivo de avançar no estudo funcional das NAGases de *M. anisopliae*, foram gerados vetores para a construção de mutantes nulos para os quatro genes de NAGases e linhagens transformantes foram obtidas utilizando-se a metodologia de transformação de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

Chitin degradation is important for filamentous fungi cell wall remodeling and, in entomopathogenic fungi, this process is pivotal for breaching the arthropod host cuticles during infection. Chitin is an important nutrient and to be efficiently used, β -N-acetylglucosaminidases (NAGases) activity must be present. After chitinase action on chitin generating N-acetylglucosamine dimers (GlcNAc)₂, NAGases hydrolyze their β -1-4 linkages producing free GlcNAc. Filamentous fungi have between 15 to 25 chitinases, but only two NAGases; then, questions arise about the actual importance of these enzymes. On a genomic scale, were identified in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* two GH20 NAGases (MaNAG1 and MaNAG2) and two GH3 NAGases (MaNAG3 and MaNAG4) from glycoside hydrolases. Phylogenetic analysis suggested subsequent duplications occurring mainly in MaNAG2 clade, resulting in ortholog clusters in several ascomycetes with a broad range life style. MaNAG1 clusters mostly with entomopathogenic species clades. MaNAG3 and MaNAG4 showed high sequence similarity and domain conservation with bacterial GH3 NAGases. Transcriptional profiles of GH20 and GH3 NAGase genes were evaluated by qPCR from eight culture conditions, representing different stages of development and different nutritional states. NAGases showed differential transcript profiles in response to different conditions, indicating an absence of a common gene regulation pattern. The variable expression profiles also suggest they may not have totally redundant roles. Relative transcription assays showed MaNAG1, MaNAG2 and MaNAG4 expression induction by chitin 1%, while MaNAG3 was induced in medium supplemented with GlcNAc 0.25%. Evolutionary relationships of MaNAG3 and MaNAG4 and their expression regulated by chitinous substrates are the first evidence of GH3 NAGases involvement in physiological cell process in entomopathogenic fungi, therefore, pointing to potential relevance on cell differentiation during *M. anisopliae* life cycle. In order to proceed on functional studies of *M. anisopliae* NAGases, vectors were constructed to produce knockout mutants for four NAGases genes and transformant strains were obtained by using fungi transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que existam mais de 600.000 espécies de fungos, e assume-se que estas espécies podem ser encontradas em quase todos os habitats da Terra. Contudo, somente uma pequena fração destas espécies está descrita (MORA et al., 2011). A maioria das espécies fúngicas desenvolveram interações saprofíticas em solo ou água, ou em associação com micorrizas. Ainda, espécies fúngicas são conhecidas por causar doenças em diversos hospedeiros, incluindo mamíferos, artrópodes e plantas (BLACKWELL, 2011), o que justifica sua utilização como modelos de estudo das interações que ocorrem entre patógenos e seus hospedeiros (SHAH; PELL, 2003; KUBICEK et al., 2011; BOURGEOIS; KUCHLER; AUCOIN, 2012; DEAN et al., 2012).

Um grupo diverso de fungos é associado a artrópodes, atuando no controle de suas populações, particularmente de insetos (BASSET et al., 2012). Os fungos associados a insetos mais bem estudados são entomopatógenos, os quais são fungos necrotróficos que ativamente penetram no exoesqueleto do hospedeiro e se proliferam na hemocele até todos os tecidos internos serem degradados. Fungos do gênero *Metarhizium* são os modelos mais estudados quanto à relação entre um fungo entomopatogênico e seus hospedeiros. Estudos sobre a evolução, ecologia, genética, bioquímica, biologia molecular e outros aspectos da biologia de fungos filamentosos, utilizam como modelo espécies deste gênero. Visto que diferentes espécies de *Metarhizium* podem infectar e matar mais de 200 espécies de artrópodes (FREIMOSER; HU; ST LEGER, 2005), alguns isolados têm sido amplamente utilizados no biocontrole de uma grande variedade de pragas, de interesse agrícola, pecuário e de saúde humana, como alternativa ao uso de pesticidas químicos (FARIA;

WRAIGHT, 2007; FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012).

É crescente o número de estudos que buscam identificar fatores envolvidos na interação entre *Metarhizium* spp. e seus hospedeiros. Estas pesquisas têm como objetivos principais a caracterização de fatores de virulência, relacionados à letalidade do processo de infecção, e os mecanismos de especificidade a hospedeiros, uma das vantagens mais importantes do controle biológico (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O sequenciamento do genoma de nove linhagens e a disponibilização de suas sequências permitiu um avanço na compreensão de diversos aspectos da biologia do fungo (GAO et al., 2011; HU et al., 2014; PATTEMORE et al., 2014; STAATS et al., 2014).

A via principal para o início da infecção de *M. anisopliae* é a degradação, rompimento e penetração através da cutícula de um hospedeiro suscetível. Este processo inicia com a adesão das partículas infectivas do fungo (conidiósporos), sobre a cutícula destes hospedeiros. Há uma reorganização na expressão gênica e uma variedade de hidrolases é secretada, bem como ocorre a síntese de proteínas envolvidas com o remodelamento da parede celular fúngica para a formação de estruturas especializadas que auxiliarão na penetração (SHAH; PELL, 2003). Estudos prévios demonstraram que *M. anisopliae* produz diversas enzimas hidrolíticas capazes de degradar os constituintes da cutícula do hospedeiro durante a fase de penetração. Dentre as enzimas que participam deste processo estão lipases, proteases e quitinases (CHARNLEY; ST. LEGER, 1991; ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994; FRAZZON et al., 2000; DE LA PAZ GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002; KRIEGER DE MORAES; SCHRANK; VAINSTEIN, 2003; BARRETO et al., 2004; BEYS DA SILVA et al., 2010).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem focado seus estudos em

caracterizar genes e enzimas cuja função seria crucial nos eventos da patogenicidade (KRIEGER DE MORAES; SCHRANK; VAINSTEIN, 2003; DA SILVA et al., 2005; BARATTO et al., 2006; STAATS, 2007; BOLDO et al., 2009; BEYS DA SILVA et al., 2010; JUNGES et al., 2014). Um grupo de enzimas de particular interesse, é as hidrolases que constituem o sistema quitinolítico fúngico, composto por quitinases e β -N-acetilglicosaminidases (NAGases), uma vez que a cutícula dos artrópodes é rica em fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica (PEDRINI; CRESPO; JUÁREZ, 2007). Além disso, a própria parede do fungo possui quitina, conferindo-a rigidez. Desta forma, o sistema quitinolítico não só teria um papel fundamental atuando diretamente na solubilização da quitina presente no exoesqueleto do hospedeiro, mas também teria um papel importante no processo de morfogênese celular, indispensáveis para a infecção. Portanto, estas enzimas teriam, pelo menos, duas funções principais, atuando nos processos de diferenciação celular, através do remodelamento da parede celular do fungo, e na degradação de quitina exógena com o objetivo de prover nutrição à célula e permitir o acesso do fungo à fonte nutricional representada pelo hospedeiro.

M. anisopliae possui 24 genes de quitinases que apresentam diferentes padrões de expressão, dependendo da fonte de carbono e tipo celular do ciclo de vida do fungo. Este perfil aponta para a participação destas quitinases em diferentes processos da biologia de *M. anisopliae* que envolvem o metabolismo de quitina, atuando de maneira não-redundante entre si (JUNGES et al., 2014). A presença de um alto número de quitinases é uma característica de genomas de fungos ascomicetos, contrastando com somente um ou dois genes de NAGases. Apesar desse relativo pequeno número de NAGases, a atividade dessas enzimas se mostrou essencial para o crescimento do micoparasita *Trichoderma atroviride* em quitina (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009). Isso se explica devido a atividade

enzimática das NAGases ser responsável pela liberação de monômeros de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) derivados do produto da clivagem da quitina realizada pelas quitinases. A GlcNAc é absorvida pelo fungo e pode ser utilizada como fonte nutricional durante seu crescimento ou na reciclagem de quitina da parede celular durante seu ciclo de vida (SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006).

Em contraste ao volume de conhecimento obtido com o estudo de quitinases em *M. anisopliae*, o papel das NAGases neste organismo modelo ainda é pouco conhecido. É necessário elucidar em quais processos celulares estas enzimas participam, se sua função é restrita à aquisição de GlcNAc como fonte nutricional para o crescimento vegetativo do fungo, ou se elas atuam na especialização celular e patogenicidade durante o processo infeccioso. Portanto, NAGases tornam-se alvos de interesse para estudos mais aprofundados da sua função na biologia de *M. anisopliae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FUNGO FILAMENTOSO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é considerado um dos organismos mais promissores no controle de pragas da pecuária, da agricultura e vetores de doenças humanas, e tem sido um dos modelos mais estudados em relação ao isolamento, seleção e caracterização de linhagens do ambiente, elucidação dos mecanismos de infecção e no desenvolvimento de formulações de biopesticidas. A **Figura 1** mostra alguns hospedeiros suscetíveis ao biocontrole por *M. anisopliae*. Dentre eles estão artrópodes o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FRAZZON et al., 2000), o gafanhoto *Schistocerca gregaria* (TOUNOU et al., 2008), a cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (DINARDO-MIRANDA et al., 2004; LOUREIRO et al., 2012), a cigarrinha das pastagens (PEREIRA; BENEDETTI; ALMEIDA, 2008) e o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (LUBECK et al., 2008). *M. anisopliae* também tem a capacidade de controlar vetores de doenças humanas, como o transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* (SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007), da malária *Anopheles gambiae* (SCHOLTE; KNOLS; TAKKEN, 2006), da doença de Chagas *Triatoma infestans* (LUZ et al., 1998) e da filariose *Culex quinquefasciatus* (LACEY; LACEY; ROBERTS, 1988). O desenvolvimento vegetativo deste fungo ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C (ARRUDA et al., 2005; LI; FENG, 2009), e pH, variando de valores de 2,0 a 8,5 (ARRUDA et al., 2005). Estas

características, somadas a sua resistência a fatores ambientais, como luz ultravioleta de diversos comprimentos de onda (BRAGA et al., 2006), tornou *M. anisopliae* o fungo mais utilizado como agente de controle biológico de inúmeras pragas (LORD, 2005).



Figura 1. O espectro de hospedeiros de *M. anisopliae* inclui pragas da agricultura, da pecuária e vetores de doenças humanas. Exemplos de cada um dos grupos de hospedeiros são demonstrados. Nas imagens menores podem ser observados cadáveres de artrópodes cobertos por conídios verdes após infecção por *M. anisopliae*. (Imagens adquiridas a partir de: www.olicana.com.br, www.blogdocontrolebiologico.com, www.fmcagricola.com.br, www.embrapa.com.br, www.saude.gov.br, www.cameronwebb.wordpress.com. A montagem é de autoria de A. Junges (JUNGES, 2014).)

Morfologicamente, *M. anisopliae* é um ascomiceto filamentoso com micélio hialino e septado, dotado de conidióforos dos quais emergem conídios cilíndricos com tamanhos

que variam de 1,8 a 3,5 μm de comprimento, organizados em colunas (ALVES, 1998) (**Figura 2**). As espécies de *M. anisopliae* que apresentam somente fase assexuada (anamórficas) compõem a maior parte das espécies atualmente conhecidas. Além da reprodução assexuada, a qual é própria do crescimento vegetativo, ocorre também a reprodução parassexual, caracterizada por fenômenos como a heterocariose e a recombinação somática (ARRUDA et al., 2005). Os teleomorfos (apresentam fase sexuada) são raros e foram anteriormente descritos como pertencentes ao gênero *Metacordyceps* (SUNG et al., 2007) e, atualmente, foi sugerido que sua nomenclatura retorne para *Metarhizium* (KEPLER et al., 2014).

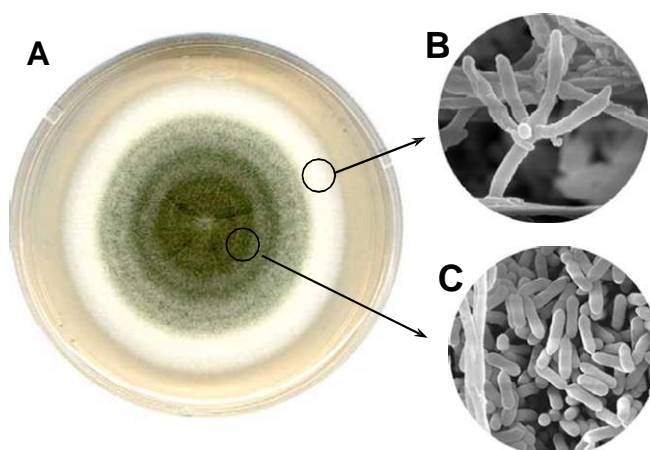


Figura 2. Aspectos morfológicos de *M. anisopliae*. Colônia após 28 dias de crescimento em meio artificial a 28 °C. **A.** Micélio branco pode ser observado no bordo da colônia. **B.** formação de conidióforos. **C.** Produção de esporos. A montagem é de autoria de C. C. Staats (STAATS, 2007). As imagens de MEV são de autoria de W. Arruda (ARRUDA et al., 2005).

Até então, somente onze espécies pertenciam ao gênero *Metarhizium* (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009), considerando as seguintes: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. brunneum*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M.*

globosum, *M. robertsii*, *M. flavoviride* e *M. frigidum*. A partir desta última atualização em 2014, decidiu-se unificar em um nome os diferentes estágios de desenvolvimento fúngico (anamorfo e teleomorfo). Diversas espécies teleomorfas de outros gêneros, as quais pertenciam ao gênero *Metacordyceps*, como *Pochonia*, *Nomuraea* e *Paecilomyces*, foram reclassificadas de maneira que o gênero *Metarhizium* agora apresenta em torno de 29 espécies.

2.2. PROCESSO DE INFECÇÃO DO FUNGO *M. ANISOPLIAE*

M. anisopliae é descrito como causador da infecção fúngica chamada *green muscardine*, devido ao aspecto da incrustação dos cadáveres de artrópodes com conídios verdes (ROBERTS; ST LEGER, 2004). Ao longo de seu ciclo de vida (**Figura 3**), esse fungo apresenta a capacidade de se diferenciar em tipos celulares, modificando-se a partir de conídios, em hifas, tubos germinativos, apressórios e blastosporos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O seu ciclo de infecção é complexo e ocorre através da penetração ativa da cutícula de seus hospedeiros artrópodes (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). Ele inicia com a deposição e adesão dos conídios sobre a cutícula de um hospedeiro suscetível onde ocorre o desenvolvimento de um tubo germinativo. O processo de infecção prossegue através da modificação da extremidade distal da hifa em apressório, o qual é uma estrutura especializada de penetração que se forma pela dilatação da extremidade da hifa. Essa estrutura de penetração utiliza força mecânica gerada a partir da pressão de turgor e também a secreção de enzimas hidrolíticas para permitir a dissolução da carapaça do hospedeiro. A formação de apressório é uma das alterações morfológicas cruciais e mais características do início da penetração de *Metarhizium* em seus

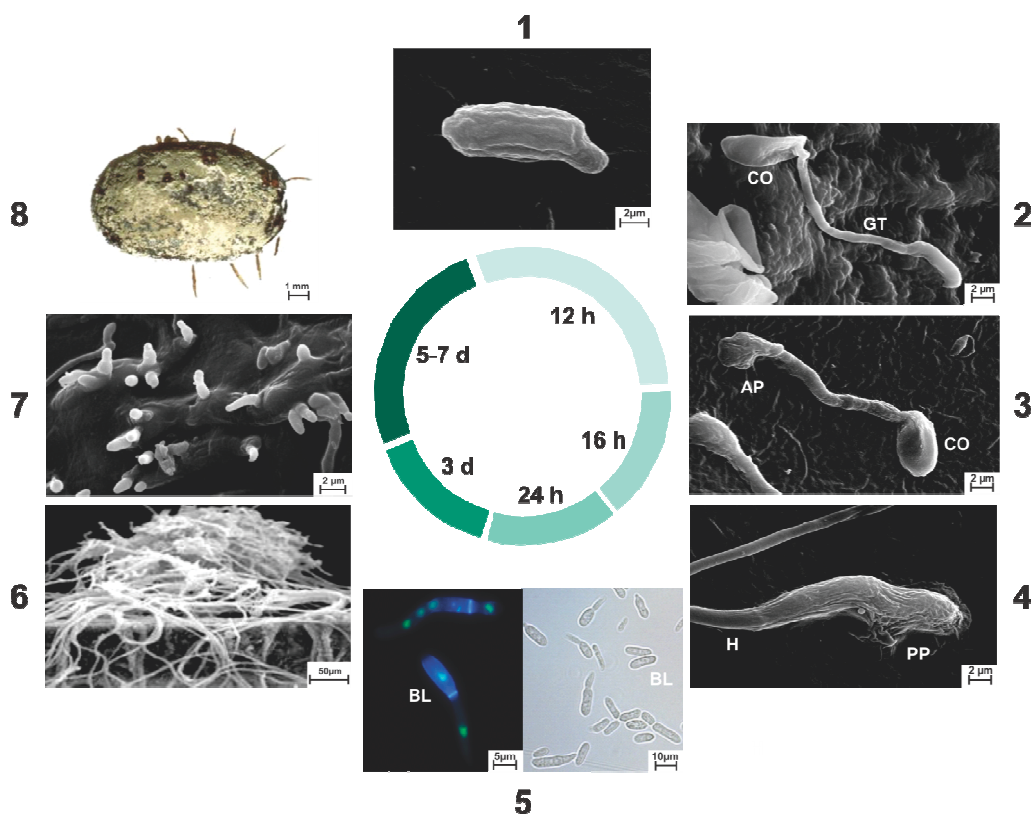


Figura 3. Ciclo de infecção de *M. anisopliae* demonstrando os tipos celulares diferenciados conforme as etapas de infecção sobre o carrapato bovino *R. microplus*. 1 – adesão do esporo na superfície do carrapato, 2 – desenvolvimento do tubo germinativo, 3 – formação de um apressório na extremidade do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

hospedeiros. A colonização do hospedeiro ocorre após a transposição da cutícula pelo fungo. Ao atingir a hemolinfa, o fungo se diferencia novamente, desta vez em células unicelulares leveduriformes, os blastosporos ou corpos de hifas (*hyphal bodies*). Esses tipos celulares apresentam a capacidade de evadir do sistema imune dos artrópodes e utilizam a principal fonte de carbono presente na hemolinfa, a trealose, para se

disseminarem. Quando os nutrientes do hospedeiro são exauridos, o fungo produz hifas a partir dos blastosporos e inicia-se o processo de extrusão de hifas na superfície do hospedeiro, finalizando-se o ciclo infectivo com a formação de novos conídios (ARRUDA et al., 2005; SEXTON; HOWLETT, 2006) (**Figura 3**).

2.3. ESTUDOS GENÔMICOS EM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

O rápido avanço das tecnologias genômicas tem revolucionado o entendimento sobre fungos entomopatogênicos. Atualmente, são conhecidas espécies de fungos que infectam e matam insetos pertencentes a diferentes filos, como Microsporidia, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Basidiomycota, e Ascomycota (SUNG et al., 2007; SHANG; FENG; WANG, 2015). Há muito mais informações genômicas de fungos ascomicetos; estão disponíveis sequências de nove linhagens de *Metarhizium* (GAO et al., 2011; HU et al., 2014; PATTEMORE et al., 2014; STAATS et al., 2014), *Beauveria bassiana* (XIAO et al., 2012), *Cordyceps militaris* (ZHENG et al., 2011), *Ophiocordyceps sinensis* (DE BEKKER et al., 2015), *O. unilateralis*, *Tolypocladium inflantum* (BUSHLEY et al., 2013), e *Hirustella thompsonii* (AGRAWAL et al., 2015).

A genômica comparativa tem facilitado a identificação de características adaptativas e as forças seletivas que agem sobre elas, aperfeiçoando nosso entendimento de como e por que fungos entomopatogênicos interagem com insetos e outros componentes de seu ambiente (WANG; ST. LEGER; WANG, 2016). Análises filogenômicas sugerem que o ancestral de muitos destes fungos seriam endófitos ou fitopatógenos, sendo a entomopatogenicidade uma característica adquirida posteriormente (GAO et al., 2011; HU et al., 2014). Estes fungos ocupam agora um amplo espectro de habitats e hospedeiros, e

seus genomas têm fornecido uma riqueza de informações sobre a evolução de características relacionadas à virulência, assim como famílias de proteínas e estrutura genômica associada com sua heterogeneidade ecológica e econutricional.

Os ascomicetos entomopatógenos melhor estudados pertencem a três famílias dentro da ordem Hypocreales: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae e Ophiocordycipitaceae. Análises de filogenia evidenciam que a entomopatogenicidade evoluiu de forma independente nestas famílias, e que gêneros de entomopatógenos da ordem Hypocreales são evolutivamente mais próximos de fitopatógenos, endófitos e micoparasitas (**Figura 4**) (WANG; ST. LEGER; WANG, 2016). Estas associações ancestrais são consistentes com repetidas transições (mudança de hospedeiro) entre plantas, fungos, e insetos hospedeiros, como sugerido por (SUH; NODA; BLACKWELL, 2001) em seu estudo com *Cordyceps* spp.

Uma análise genômica comparativa entre sete genomas de *Metarhizium* (Clavicipitaceae) confirmou o gênero sendo uma linhagem monofilética que divergiu de patógenos de plantas e endófitos a cerca de 231 milhões de anos, e colocou a espécie hemíptero-específica *M. album*, como basal ao clado *Metarhizium*, com uma divergência estimada de aproximadamente 117 milhões de anos (HU et al., 2014). Nesse estudo foi sugerido que a estreita proximidade física entre um ancestral de *M. album* associado a plantas e com hemípteros sugadores de plantas, deve ter facilitado a mudança de hospedeiro, de endófito para a entomopatogenicidade (HU et al., 2014).

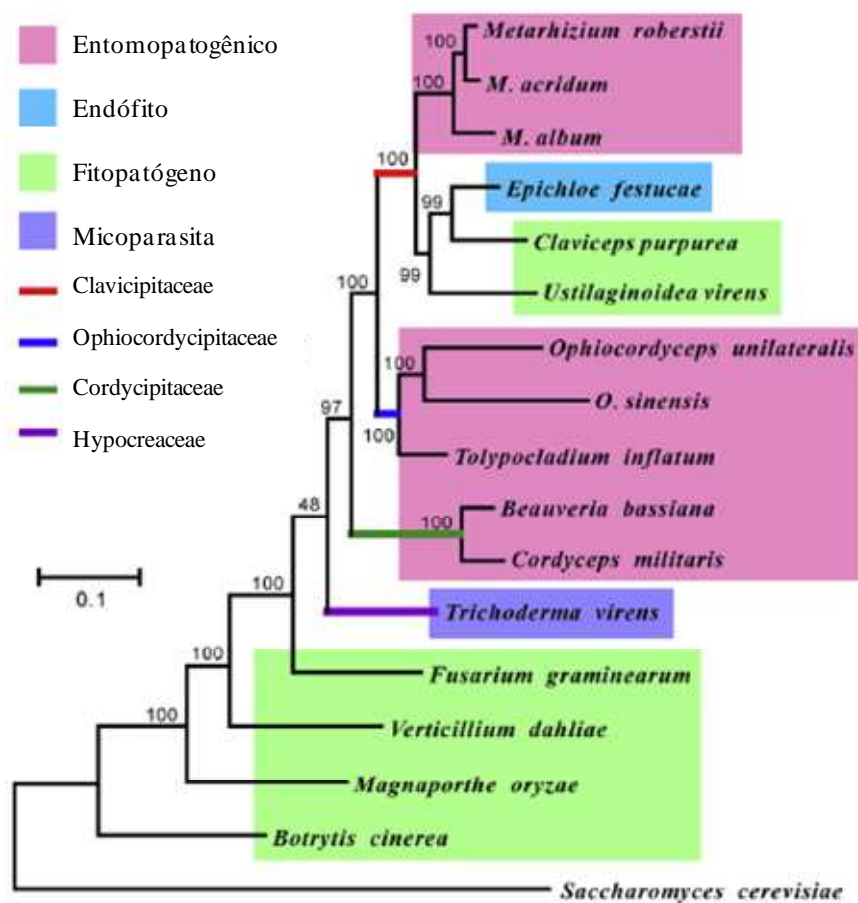


Figura 4. Relações filogenéticas de fungos entomopatogênicos com outros fungos. Adaptado de (WANG; ST. LEGER; WANG, 2016).

Comparados a modelos fúngicos clássicos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Metarhizium spp.* e *Beauveria spp.* são extraordinariamente versáteis. *Metarhizium*, por exemplo, contém espécies que possuem uma estreita gama de hospedeiros artrópodes (por exemplo, *M. album*, *M. acridum*) e outras que possuem uma ampla gama de hospedeiros artrópodes (por exemplo, *M. anisopliae*, *M. robertsii*), além de algumas espécies saprófitas e outras colonizadoras de rizosfera e raízes de plantas. De forma compatível com seus diversificados estilos de vida, a maioria das espécies de *Metarhizium* exibe um metabolismo extremamente flexível. Este metabolismo permite que elas consigam se

desenvolver sobre diversas condições ambientais, com escassez de nutrientes (RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008) e na presença de compostos que seriam letais para outros fungos (ROBERTS; ST. LEGER, 2004; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2015).

Como mencionado anteriormente, algumas espécies de *Metarhizium* têm um amplo espectro de hospedeiros, enquanto que outras apresentam especificidade para determinadas famílias de insetos e, portanto, podem ser utilizadas para testar hipóteses sobre especiação e especificidade de hospedeiros. A análise genômica comparativa de sete espécies revelou uma especiação direcional contínua de espécies especialistas, com estreita gama de hospedeiros (*M. album* e *M. acridum*, específicos para hemípteros e acridídeos, respectivamente), para espécies transicionais com uma gama de hospedeiros intermediária (*M. majus* e *M. guizhouense*, ambos possuem número de hospedeiros limitado a duas ordens de insetos), e, por fim, a espécies generalistas (*M. anisopliae*, *M. robertsii* e *M. brunneum*) (HU et al., 2014). A especialização em *Metarhizium* está associada com retenção de sexualidade e rápida evolução de sequências proteicas existentes, enquanto que a generalização está associada com a perda de mecanismos de defesa genômicos, reestruturação genômica, transferência gênica horizontal, perda de sexualidade e expansão de famílias gênicas (GAO et al., 2011; XIAO et al., 2012; HU et al., 2014).

2.4. QUITINA NA PAREDE CELULAR FÚNGICA E NO EXOESQUELETO DE ARTRÓPODES

A quitina faz parte da cutícula dos artrópodes, sendo uma barreira muito importante na defesa contra a infecção de vírus e bactérias. Está presente desde fungos até moluscos e artrópodes em geral, e confere rigidez às estruturas que compõe

(CABIB, 1987; BERNARD; LATGÉ, 2001; ADAMS, 2004). É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, precedida somente pela celulose. A quitina, $(C_8H_{13}O_5N)_n$, é um homopolímero linear de subunidades de GlcNAc unidas por ligações β -1,4. Na natureza, duas maiores classes de quitina são encontradas, denominadas quitina α e β , de acordo com o rearranjo antiparalelo ou paralelo das cadeias de GlcNAc, respectivamente (**Figura 5**) (SEIDL, 2008). As microfibrilas de quitina também podem apresentar um terceiro tipo de arranjo de configuração mista (γ) (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006). As GlcNAc são monossacarídeos derivados da glicose que contém um grupo acetamida ligado ao carbono 2.

A diferenciação de tipos celulares apresentada pelos fungos durante o seu ciclo de vida requer a atuação combinada de enzimas que promovam o remodelamento adequado da parede celular para permitir as mudanças entre os tipos celulares. Tanto o local da germinação do esporo quanto os sítios de uma nova ramificação nas paredes rígidas das hifas precisam ser “fragilizados” para permitir a formação de um novo ápice, e as enzimas líticas são componentes óbvios neste processo. As paredes cilíndricas das hifas, ao contrário do seu ápice, são estruturas rígidas. As microfibrilas de quitina são maiores, mais cristalinas e apresentam ligações cruzadas (covalentes e não-covalentes) com outros componentes da parede celular (β -glicanas). A parede apical é plástica, formada por polímeros que ainda não apresentam ligações cruzadas entre si, e que se torna progressivamente rígida pelas ligações entre seus polímeros (WESSELS, 1994). A formação de ramificações está associada com o acúmulo localizado de hidrolases, como as quitinases, glicanases e transglicosilases.

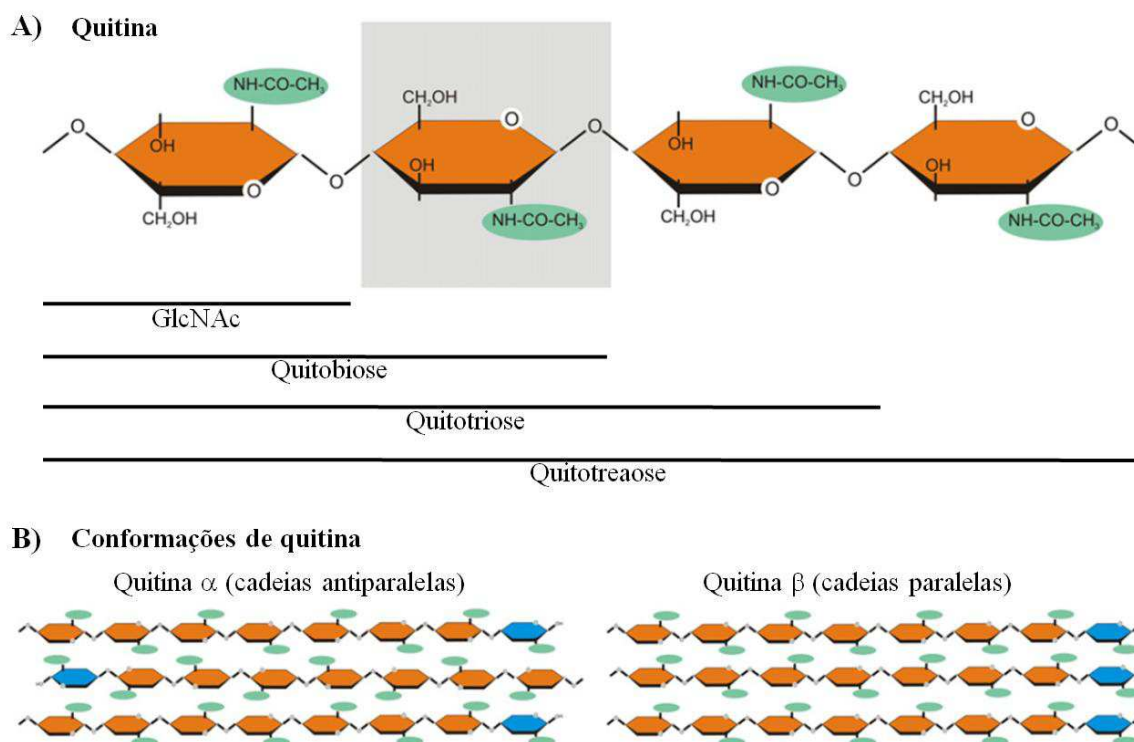


Figura 5. Molécula de quitina. **A.** Estrutura química da quitina. O quadrado cinza indica uma subunidade de GlcNAc. **B.** Rearranjos das cadeias de quitina. Adaptado de (SEIDL, 2008).

2.5. SISTEMA QUITINOLÍTICO: QUITINASES E β -N-ACETIL-GLICOSAMINIDASES (NAGases)

A presença de um sistema quitinolítico em fungos entompatogênicos tem duas funções biológicas principais: Primeiramente, a quitina é o principal componente da parede celular fúngica. Portanto, enzimas que degradam quitina atuam no remodelamento celular, necessário para o crescimento vegetativo das hifas e para os estágios de diferenciação celular que o fungo realiza durante o seu ciclo de infecção (SEIDL, 2008; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Outra função diz respeito à entompatogenicidade, pois a infecção de

hospedeiros artrópodes requer a prévia hidrólise da quitina presente em seus exoesqueletos (LEGER et al., 1991; ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1991).

A hidrólise de quitina a monômeros de GlcNAc é realizada por um sistema quitinolítico composto por um grupo diverso de enzimas. As quitinases (EC 3.2.1.14) agem nas ligações β -1,4 dos polímeros de quitina, produzindo cadeias curtas e N-acetilquitoligossacarídeos. Por sua vez, NAGases (EC 3.2.1.52) hidrolizam as ligações β -1,4 dos dímeros de GlcNAc (diacetilquitobiose), produzindo monossacarídeos GlcNAc livres (DUO-CHUAN, 2006). Estas duas categorias de enzimas atuam de maneira consecutiva e sinergisticamente para realizar a degradação total da quitina (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012; SWIONTEK BRZEZINSKA et al., 2014).

De acordo com a posição do ataque hidrolítico à quitina, as quitinases podem ser classificadas em duas classes: endoquitinases, que clivam a molécula aleatoriamente nos sítios internos gerando múltiplos solúveis de GlcNAc, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose; e exoquitinases, que catalisam a liberação gradual apenas de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora das cadeias de quitina (DUO-CHUAN, 2006). NAGases e quitinases diferem essencialmente em seus padrões de clivagem (**Figura 6**). As NAGases catalisam a liberação de resíduos de GlcNAc a partir da extremidade não redutora de quitina, mas em geral, elas possuem maior afinidade por dímeros diacetilquitobiose (GlcNAc)₂ convertendo-os em monômeros (HORSCH et al., 1997). É importante que estas enzimas não sejam referidas como exoquitinases, com as quais frequentemente são confundidas na literatura (**Figura 6**).

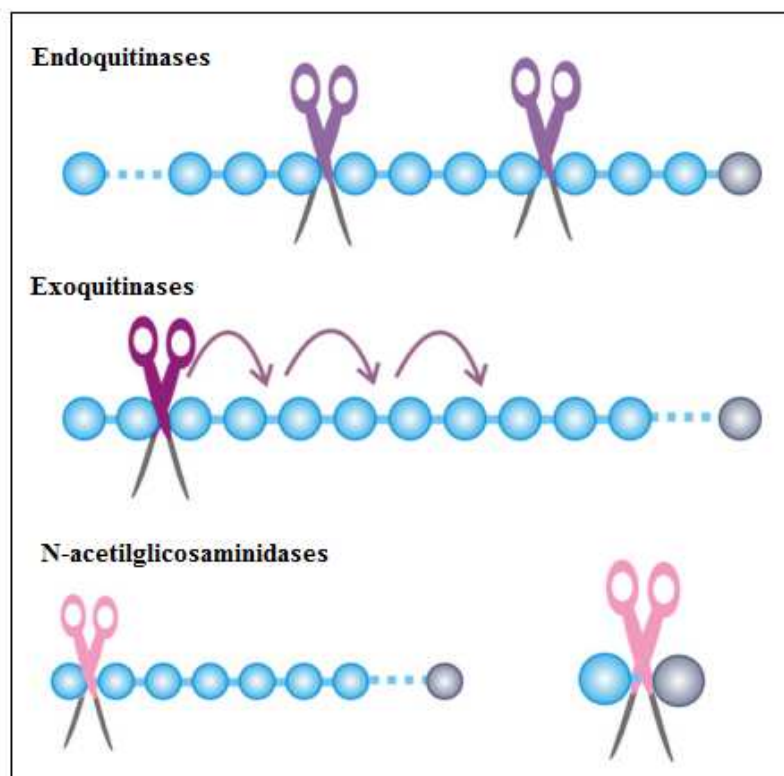


Figura 6. Representação esquemática dos principais padrões de clivagens de enzimas quitinolíticas. As subunidades de quitina são mostradas em azul claro e a extremidade redundante em cinza. As linhas pontilhadas indicam que o tamanho do substrato é mais extenso do que o apresentado na figura. Adaptado de (SEIDL, 2008).

As NAGases desempenham importante função vegetativa em microrganismos heterotróficos. Sua atuação libera monômeros de GlcNAc a partir de substratos diacetilquitobiose ou acetil-quitooligosacarídeos maiores, obtidos pela ação de quitinases em quitina insolúvel (SAHAI; MANOCHA, 1993). A GlcNAc pode ser, então, utilizada como fonte de carbono e nitrogênio (LEAKE; READ, 1990). Assim, além de serem diretamente utilizadas na formação da quitina que compõe a parede celular, as moléculas de GlcNAc podem ser utilizadas como fonte nutricional quando, no interior da célula, são fosforiladas transformando-se em moléculas de N-acetil-D-glicosamina-6-fosfato. GlcNAc-6-P perde o radical acetil pela ação de deacetilases produzindo Glicosamina-6-P.

A molécula Glicosamina-6-P é desaminada, formando Frutose-6-P, que pode entrar diretamente na via glicolítica (**Figura 7**) (BISWAS; SINGH; DATTA, 1979; SINGH; DATTA, 1979a, 1979b, 1979c; HOWARD et al., 2003; DUO-CHUAN, 2006; MERZENDORFER, 2011; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012; CHAVAN; DESHPANDE, 2013). A utilização de GlcNAc como única fonte de carbono e nitrogênio é tão efetiva quanto a de glicose, uma vez que GlcNAc é altamente solúvel e é rapidamente incorporada pela célula (BHATTACHARYA; BANERJEE; DATTA, 1974; BHATTACHARYA; PURI; DATTA, 1974).

2.6. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA N-ACETIL-D-GLICOSAMINA (GlcNAc)

A GlcNAc é mais bem conhecida por desempenhar importante papel estrutural na superfície celular. Este aminoaçúcar é componente da matriz extracelular de células animais, da parede celular de peptidoglicanas em bactérias e da quitina na parede celular fúngica (NASEEM et al., 2012). Em fungos, GlcNAc também é importante para a modificação de proteínas da superfície celular, fazendo parte da cadeia polissacarídica que é adicionada a proteínas N-glicosiladas e, também, é o alicerce na síntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que mantêm certas proteínas atracadas à membrana plasmática (**Figura 7**) (KONOPKA, 2012).

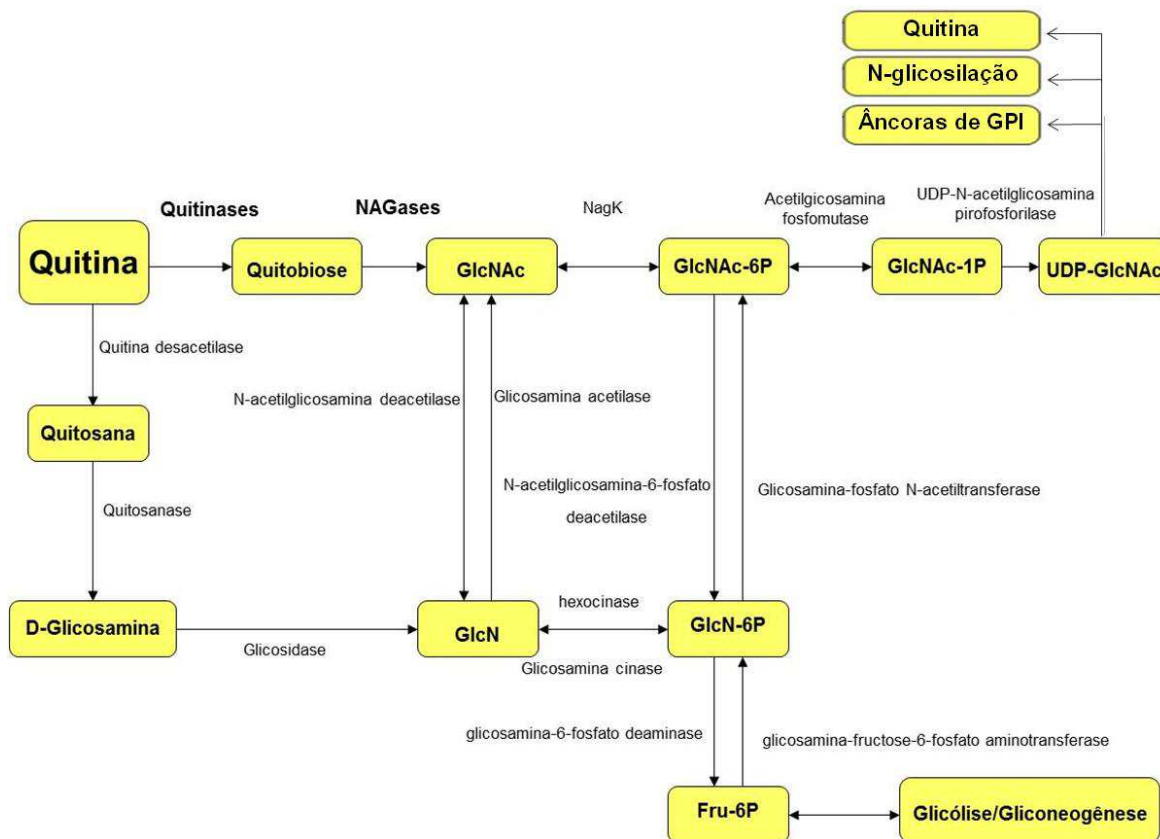


Figura 7. Vias catabólicas e anabólicas da quitina em fungos filamentosos. Os monômeros de GlcNAc gerados a partir da quebra do polímero de quitina podem ser utilizados nas vias Glicólise/Gliconeogênese, bem como para N-glicosilação de proteínas, composição de âncoras-GPI e síntese de quitina da parede celular (HOWARD et al., 2003; DUO-CHUAN, 2006; MERZENDORFER, 2011; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012; KONOPKA, 2012; CHAVAN; DESHPANDE, 2013).

Estudos têm identificado novas funções para GlcNAc, elucidando sua participação nas vias de sinalização celular. Por exemplo, GlcNAc induz *Candida albicans* (SIMONETTI; STRIPPOLI; CASSONE, 1974; ALVAREZ; KONOPKA, 2007; NASEEM et al., 2011), *C. lusitaniae* (REEDY; FLOYD; HEITMAN, 2009), e *Yarrowia lipolytica* (PÉREZ-CAMPO; DOMÍNGUEZ, 2001) a alterar seu crescimento como leveduras unicelulares para uma forma multicelular com hifas filamentosas ou células pseudo-hifais. Análises genéticas de *C. albicans* indicam que GlcNAc atua pelo menos duas vias de

sinalização. Uma parece ativar a sinalização via cAMP, o qual dispara a morfogênese hifal e a expressão de fatores de virulência (CASTILLA; PASSERON; CANTORE, 1998; LEBERER et al., 2001; GUNASEKERA et al., 2010). A segunda via de sinalização, independente de cAMP, resulta no aumento da expressão de genes necessários para catabolizar GlcNAc (YAMADA-OKABE et al., 2001; GUNASEKERA et al., 2010).

A participação de GlcNAc como indutor das vias de transdução de sinal em bactérias e células animais também tem sido descrita. A bactéria patogênica *Escherichia coli* responde a GlcNAc alterando a expressão da fímbria (SOHANPAL et al., 2004) e fibras CURL1 que promovem a formação de biofilme (BARNHART; LYNEM; CHAPMAN, 2006), e na bactéria de solo *Streptomyces coelicolor*, GlcNAc estimula a realização de mudanças morfogênicas e a produção de antibióticos (RIGALI et al., 2006, 2008). Em células animais, GlcNAc influencia a sinalização celular através de modificações pós-traducionais de proteínas por glicosilação. Um tipo de glicosilação que ocorre é o atracamento de O-GlcNAc a resíduos de serina e treonina, os quais regulam uma variedade de proteínas intracelulares, incluindo fatores de transcrição como NF κ B, c-myc, e p53 (HART et al., 2011). GlcNAc também tem efeito na transdução de sinal por alterar o grau de ramificações de glicanas N-ligadas à proteínas de superfície, que pode alterar sua estabilidade ou atividade de sinalização (DENNIS; NABI; DEMETRIOU, 2009).

Uma questão fundamental para a participação de GlcNAc como molécula sinalizadora é a regulação de sua taxa intracelular. As células devem coordenar a captação exógena de GlcNAc com a sua síntese *de novo*, e também se GlcNAc será utilizada nas vias catabólicas que a quebram para nutrição, ou se a desviam para vias anabólicas que sintetizam UDP-GlcNAc necessário para sua utilização na modificação de proteínas e

formação de estruturas da superfície celular. Este equilíbrio é essencial, pois desequilíbrios no metabolismo de GlcNAc se mostra deletério para o crescimento celular (BERNHEIM; DOBROGOSZ, 1970; NADERER; HENG; MCCONVILLE, 2010; NASEEM et al., 2011).

Em fungos, UDP-GlcNAc é o substrato (doador de açúcar) para a síntese de quitina, glicanas N-ligadas e âncoras-GPI, tornando-o um importante metabólito cuja síntese é estreitamente controlada. Provavelmente, a N-glicosilação e âncoras-GPI não são as fontes de GlcNAc exógena para sinalização, visto que glicanas N-ligadas são relativamente estáveis na superfície celular e GlcNAc é desacetilado durante a síntese de âncoras-GPI (KONOPKA, 2012). Por outro lado, a quitina é rapidamente reciclada durante o remodelamento da parede celular que ocorre para permitir a expansão e diferenciação celular. Portanto, a degradação de quitina é a fonte mais provável de GlcNAc que estará disponível para a sinalização celular. Desta forma, o papel das NAGases como enzimas fundamentais para a total degradação de quitina e liberação de GlcNAc livre, se torna ainda mais complexa na fisiologia celular de fungos (KONOPKA, 2012).

2.7. QUITINASES

As glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-) constituem um grupo de enzimas as quais hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e um motivo não-carboidrato. O banco de dados CAZY (*Carbohydrate-Active enZymes Database*, www.cazy.org) descreve as famílias de domínios funcionais catalíticos e de ligação a carboidratos que são estruturalmente relacionados em enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas (CANTAREL et al., 2009; LOMBARD et al.,

2014). Atualmente o CAZY classifica as glicosil hidrolases em 133 famílias diferentes, as quais são categorizadas conforme a similaridade de suas sequências de aminoácidos.

As quitinases são classificadas em duas famílias de glicosil hidrolases, famílias GH18 e GH19, e essa diferenciação se baseia na similaridade das sequências de aminoácidos, na presença de motivos conservados e na estrutura das proteínas. Não há conservação de sequências de aminoácidos entre membros da família GH18 e da família GH19. Além disso, as proteínas dessas duas famílias distintas apresentam diferentes estruturas tridimensionais e mecanismos enzimáticos (DAVIES; HENRISSAT, 1995). As quitinases de fungos descritas até então pertencem à família 18 das glicosil hidrolases.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo das quitinases de *M. anisopliae* (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O primeiro gene de quitinase a ser isolado neste fungo foi denominado *chit1*, correspondente a uma enzima predita de 42 kDa (BOGO et al., 1998), e de estreita concordância com a quitinase de 45 kDa previamente identificada (LEGER et al., 1996). Este gene foi clonado em plasmídeos de expressão em *Escherichia coli* e análises revelaram tratar-se de uma endoquitinase (BARATTO et al., 2003). Contudo, a superexpressão em *M. anisopliae* do gene *chit1*, apesar de ter aumentado consideravelmente os níveis de atividade quitinolítica extracelular, não provocou aumento da virulência frente a lagartas de *Manduca sexta* (SCREEN; HU; ST. LEGER, 2001). Outras duas quitinases de *M. anisopliae* foram descritas por nosso grupo, *chi2* e *chi3*. Mutantes nulos foram gerados e, em ambas as linhagens deletadas, houve uma diminuição na virulência frente ao hospedeiro *D. peruvianus*, quando comparadas com a linhagem selvagem (BOLDO et al., 2010; STAATS et al., 2013). Esses dados indicam a participação destas quitinases de *M. anisopliae* na virulência contra hospedeiros. A expressão do gene *chi2* é regulada por diferentes fontes de carbono, sendo mais

expressa em meios contendo quitina cristalina, GlcNAc em baixas concentrações e cutículas do carrapato *R. microplus* e reprimida em meios contendo glicose (BARATTO et al., 2006). A quitinase CHIT30 (codificada pelo gene *chi3*) foi a primeira quitinase a apresentar tanto atividade de endo- quanto de exoquitinase. Experimentos mostraram que esta quitinase possui expressão regulada de acordo com o tipo de fonte de carbono disponibilizada, sendo mais expressa em meios contendo quitina cristalina, GlcNAc em baixas concentrações e cutícula do carrapato *R. (Boophilus) microplus* e reprimida em meios contendo glicose (DA SILVA et al., 2005).

Uma busca realizada no genoma de *M. anisopliae* identificou 24 genes que pertencem à família 18 das glicosil hidrolases, incluindo os três genes que codificam quitinases previamente determinados e nomeados de *chi1*, *chi2* e *chi3*. Essas quitinases putativas foram classificadas, com base na organização de seus domínios e em análises filogenéticas, nos subgrupos previamente descritos A, B e C e em um novo subgrupo D. Além disso, três dessas proteínas GH18 puderam ser classificadas como endo-N-acetil-glicosaminidases (ENGases) putativas, enzimas que estão associadas com deglicosilação e foram, portanto, classificadas em um novo subgrupo E (JUNGES et al., 2014). A partir do trabalho de Junges e colaboradores (2014), as quitinases de *M. anisopliae* passaram a ser denominadas ChiMaA (ChiMaA1 a ChiMaA9), ChiMaB (ChiMaB1 a ChiMaB7), ChiMaC (ChiMaC1 a ChiMaC4) e ChiMaD (ChiMaD1); e o termo *chima* foi utilizado para a nomenclatura dos genes. As três ENGases foram denominadas MaEng18A, MaEng18B e MaEng18C

As 24 enzimas GH18 apresentaram variados perfis transcricionais frente a diferentes fontes de carbono e em diferentes tipos celulares do fungo (micélio, conídio, apressório e blastosporo), indicando a ausência de um padrão comum de indução/repressão, sugerindo não existir um papel totalmente redundante entre elas. Esta

diversidade de perfis de expressão deve indicar diferentes funções biológicas no desenvolvimento e ciclo de vida de *M. anisopliae* (JUNGES et al., 2014).

2.8. β -N-ACETILGLICOSAMINIDASES (NAGases)

As NAGases são enzimas amplamente distribuídas em diversos organismos, desde bactérias, fungos, artrópodes, plantas e metazoários, estando envolvidas em diferentes processos fisiológicos (LIU; YAN; YANG, 2012). De acordo com a classificação do CAZY, NAGases pertencem a três famílias das glicosil hidrolases: GH3, GH20 e GH84 (CANTAREL et al., 2009). As NAGases da família GH3 e GH84 são distribuídas principalmente em diversas bactérias e células de metazoários, respectivamente. As NAGases da família GH20 são enzimas versáteis, abundantes principalmente em fungos e insetos. Embora essas três famílias compartilhem enzimas funcionalmente relacionadas, elas não possuem homologia de sequências, diferindo em suas estruturas e mecanismos de ação (SLÁMOVÁ et al., 2010; LIU; YAN; YANG, 2012).

NAGases GH3, GH20 e GH84 utilizam diferentes mecanismos catalíticos para a remoção de GlcNAc a partir da extremidade não redutora de seus substratos (VOCADLO; WITHERS, 2005; SLÁMOVÁ et al., 2010). As NAGases da família GH20 utilizam um mecanismo de catálise assistida por substrato (*substrate-assisted mechanism*): o oxigênio do grupo acetamida C-2 do substrato age como o nucleófilo catalítico, formando um intermediário oxazolina (**Figura 8-B**). Este mecanismo é também utilizado pela família GH84, como demonstrado para a O-GlcNAcase humana (MACAULEY; STUBBS; VOCADLO, 2005), uma enzima de importância terapêutica para doença de Alzheimer (YUZWA et al., 2008). Apesar da similaridade do mecanismo e arquitetura do “*cleft*” do

sítio ativo, as NAGases da família 84 diferem significativamente da família GH20 em suas sequências de aminoácidos (MARTINEZ-FLEITES et al., 2009). Diferentemente das famílias GH20 e GH84, a família GH3 não utiliza o mecanismo envolvendo a intervenção do substrato. Estas NAGases empregam um carboxilato como nucleófilo catalítico (VOCADLO et al., 2000). Este representa o mecanismo de substituição dupla em duas etapas (*two-step double displacement mechanism*) das glicosil hidrolases (VOCADLO et al., 2000). Neste mecanismo, dois resíduos ácidos (geralmente duas asparaginas) estão envolvidas, uma agindo como nucleófilo e a outra como ácido/base catalítico (**Figura 8-A**). Estas diferenças são importantes, pois permitem o desenvolvimento de inibidores específicos para NAGases GH20/GH84 ou GH3. A inibição específica de NAGases é uma

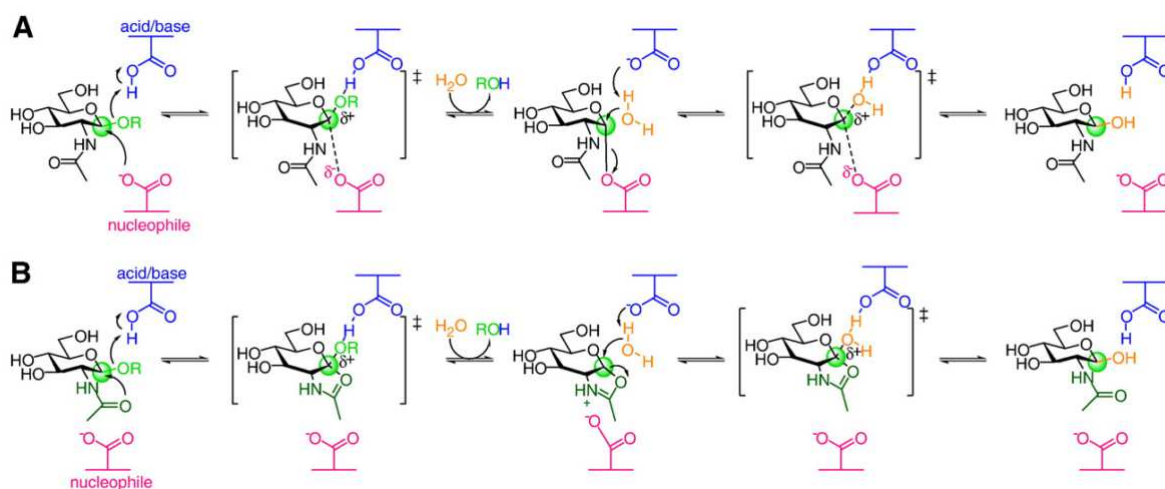


Figura 8. Mecanismos catalíticos das NAGases das famílias GH20, GH84 e GH3.

A. *Double-displacement retaining mechanism* utilizado por NAGases da família GH3: Na primeira etapa (glicosilação), um nucleófilo enzimático ataca o carbono anomérico do substrato e uma glicosil-enzima intermediária é formada. Na segunda etapa (deglicosilação), o resíduo ácido/base deprotona uma molécula de água para atacar a glicosil-enzima intermediária produzindo uma nova ligação glicosídica. **B.** *Substrate-assisted mechanism* das NAGases das famílias GH20 e GH84: o nucleófilo não é fornecido pela enzimas, mas pelo grupo 2-acetamida do substrato, ocasionando a formação de uma oxazolína como intermediário. Adaptado de (SLÁMOVÁ et al., 2010).

excelente abordagem para regulação de importantes processos fisiológicos, podendo oferecer benefícios tanto no tratamento de doenças quanto no controle de pragas (HORSCH et al., 1997; SCIGELOVA; CROUT, 1999).

2.8.1. NAGases da família GH84

NAGases GH84 estão presentes em células de metazoários. Nestes organismos, elas catalisam a remoção de GlcNAc de proteínas citoplasmáticas e nucleares modificadas por O-GlcNAcilação (HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; HURTADO-GUERRERO; DORFMUELLER; VAN AALTEN, 2008; ZEIDAN; HART, 2010). O interesse nesta atividade enzimática encontra-se na função regulatória que a O-GlcNAcilação exerce, a qual é um processo fisiológico essencial. A O-GlcNAcilação envolve a ligação de GlcNAc a um resíduo de serina ou treonina por uma ligação β , sendo que estes mesmos resíduos de serina/treonina também podem ser fosforilados. O equilíbrio de O-GlcNAcilação e fosforilação pode ser regulado pela NAGase GH84, sendo importante para a normalidade do ciclo celular. A perda deste equilíbrio está relacionada a diversas doenças humanas, incluindo câncer, diabetes tipo II e doença de Alzheimer; entretanto, os mecanismos moleculares ainda não estão elucidados (HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; HURTADO-GUERRERO; DORFMUELLER; VAN AALTEN, 2008; ZEIDAN; HART, 2010).

2.8.2. NAGases da família GH3

As NAGases da família GH3 são conhecidas como um pequeno grupo de enzimas tipicamente de origem bacteriana. Os diversos estudos realizados com estas enzimas tiveram como principal objetivo a purificação e caracterização de suas propriedades

bioquímicas, visando sua aplicação em processos biotecnológicos. Até o momento, muitas NAGases GH3 bacterianas já foram purificadas e caracterizadas, tais como de *Clostridium paraputrificus* M-21 (LI et al., 2002), *Phoma glomerata* (ZHURAVLEVA; LUK'IANOV; PIVKIN, 2004) e *Trichomonas vaginalis* (SANON et al., 2005). Diversos genes de NAGases também têm sido clonados e expressos, incluindo os genes de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (TSUJIBO; HATANO; MIKAMI, 1998), *Vibrio harveyi* 650 (SUGINTA et al., 2010), *Vibrio furnissii* (CHITLARU; ROSEMAN, 1996), *Cellulomonas fimi* (MAYER et al., 2006), *Symbiobacterium thermophilum* (OGAWA et al., 2006), *Aeromonas hydrophila* (LAN et al., 2008), *Paenibacillus* sp. TS12 (SUMIDA et al., 2009), *Thermotoga marítima* (CHOI et al., 2009) e *Thermotoga neapolitana* (CHOI et al., 2009). Esses estudos geralmente analisaram a atividade catalítica destas enzimas sobre diferentes substratos derivados de quitina ou substratos sintéticos para, assim, poder determinar suas especificidades. Entretanto, são escassos os estudos em que foi realizada a análise funcional dos genes destas NAGases.

As NAGases GH3 bacterianas podem exercer diferentes funções além de sua participação na cascata quitinolítica. Nas bactérias marinhas *Vibrio furnissii* e *Alteromonas* sp., NAGases participam da degradação de quitina exógena e na indução de quitinases (TSUJIBO et al., 1994; KEYHANI; ROSEMAN, 1996). Entretanto, em bactérias gram-negativas foi encontrada a enzima NAGZ. Em *E. coli*, esta NAGase GH3 não é capaz de hidrolisar (GlcNAC)₂, mas hidrolisa as ligações glicosídicas β-1,4 entre GlcNAc e ácido anidro-N-acetilmurâmico nos produtos de degradação da parede celular, seguida de sua importação para o interior da célula durante o processo de reciclagem de muropeptídeos da parede celular (CHENG et al., 2000).

Todas as NAGases conhecidas em fungos pertencem à família GH20, exceto pela enzima RmNAG do zigomiceto *Rhizomucor miehei*, pertencente à família GH3. Shaoqing Yang e colaboradores (2014) clonaram, purificaram e realizaram sua caracterização bioquímica, na qual a enzima apresentou atividade hidrolítica sobre N-acetilquitoligossacarídeos (GlcNAc)₂₋₃ (YANG et al., 2014). Esta descoberta abriu a possibilidade para a existência de NAGases GH3 em outras espécies fúngicas, especialmente em ascomicetos, considerando-se o fato de que este grupo de fungos possui como característica genômica a expansão de genes da maquinaria quitinolítica (SEIDL et al., 2005; SEIDL, 2008; JUNGES et al., 2014).

2.8.3. NAGases da família GH20

Em fungos, as NAGases da família GH20 são bem descritas por desempenharem função fisiológica fundamental no complexo sistema quitinolítico da parede celular. O chamado sistema binário em tandem (*tandem binary system*), expresso sob um regime de intensa repressão catabólica, consiste de quitinases e NAGases e é responsável pelo controle da lise da quitina na parede celular. Simultaneamente, ele regula sua reconstituição para permitir a expansão apical da hifa e suas ramificações laterais e impede o rompimento celular (RAST et al., 1991, 2003).

Os genomas de fungos filamentosos ascomicetos contêm em média 15 a 25 genes codificando quitinases, mas somente dois ou três genes codificando NAGases (SEIDL, 2008; JUNGES et al., 2014). A grande variação no número de genes de quitinases contidos em genomas fúngicos pode ser observada pela diferença de um gene em *Schizosaccharomyces pombe* até 36 genes em *Trichoderma virens* (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012). As diferentes espécies do gênero *Metarhizium* que foram sequenciadas,

M. robertsii, *M. acridum*, *C. militaris* e *M. anisopliae*, exibem alto conteúdo de genes de quitinases (GAO et al., 2011; ZHENG et al., 2011; STAATS et al., 2014).

As NAGases em fungos facilitam a liberação de nutrientes durante as fases de crescimento saprofítico, micoparasítico e estão, possivelmente, envolvidas na entomopatogênese (CHARNLEY; ST. LEGER, 1991) e no biocontrole de fungos fitopatogênicos (LORITO et al., 1993). Fungos micoparasíticos, como *Clonostachys* sp. e *Trichoderma* sp., produzem NAGases sob indução específica por quitina ou paredes celulares fungicas, portanto, servindo como eficientes agentes de biocontrole contra diversos fitopatógenos de importância econômica (BRUNNER et al., 2003; LISBOA DE MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004; MAMARABADI; JENSEN; LÜBECK, 2009).

As NAGases melhor caracterizadas em fungos são as de espécies micoparasitas do gênero *Trichoderma*, tais como *T. atroviride* (teleomorfo *Hypocrea atroviridis*), *T. harzianum*, *T. virens* (*H. virens*) and *T. asperellum*. Quitinases e NAGases estão envolvidas na hidrólise da parede celular durante o ataque micoparasítico (BENÍTEZ et al., 2004). Duas NAGases, NAG1 e NAG2, foram clonadas de diferentes espécies de *Trichoderma*, sendo mostrado que elas são dímeros ativos e que sua expressão gênica pode ser induzida por fontes de carbono quitinosas tais como GlcNAc, quitooligosacarídeos, quitina coloidal e paredes celulares de fungos (DRABORG et al., 1995; PETERBAUER et al., 1996, 2002; MACH et al., 1999; KIM et al., 2002; RAMOT et al., 2004; SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006). Além disso, a atividade de NAGase foi aumentada em fontes de carbono não-quitinosas como α -glicanas e oligossacarídeos contendo galactose, assim como houve regulação transcricional positiva dos genes *nag1* e *nag2* sob as respectivas condições de crescimento (SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006). Neste

mesmo estudo, os níveis de transcrição basal de *nag1* e *nag2*, e as atividades de NAGase correspondentes foram detectadas sob condições de crescimento não indutoras, sugerindo que, possivelmente, estas enzimas têm papel no remodelamento da parede celular. Em *T. atroviride*, a quitina não pode ser utilizada como fonte nutricional sem a atividade de NAGases, mesmo este fungo possuindo aproximadamente 30 quitinases (BRUNNER et al., 2003). Mesmo com a disrupção do gene *nag1* ou de *nag2*, *T. atroviride* conseguiu crescer e esporular normalmente em meio suplementado com quitina, entretanto, a linhagem $\Delta nag1/\Delta nag2$ apresentou esses dois processos defeituosos.

Esses dados sugerem que a presença de pelo menos uma das duas enzimas, NAG1 e NAG2, é essencial para o crescimento em quitina por hidrolisar o dímero quitobiose, e implica que a conversão extracelular do dímero em monômeros é necessária para a assimilação desta fonte de carbono, e que somente o monômero pode ser assimilado pelo fungo. Quando cultivado em meio suplementado com quitobiose, a linhagem $\Delta nag1/\Delta nag2$ não cresce, provando que NAG1 e NAG2 juntas são responsáveis pela degradação da quitobiose (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009). Portanto, a diversidade de genes de quitinases contrasta com o número relativamente baixo de genes de NAGases e revela sua importância fundamental no metabolismo da quitina. Por outro lado, os perfis de assimilação de 95 fontes de carbono em linhagens mutantes para os genes *nag1* e *nag2* foram similares a da linhagem selvagem, sugerindo que NAGases não são essenciais para o crescimento normal de *T. atroviride* em fontes de carbono não-quitinosas (SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006).

A regulação da atividade quitinolítica secretada por *T. atroviride* se dá, em parte, pela sua enzima NAG1, codificada pelo gene *nag1*. Trata-se de uma enzima extracelular parcialmente ligada à parede celular que, dependendo dos níveis extracelulares de

quitobiose e GlcNAc, regula a ativação da expressão de quitinases, pois mutantes nulos do gene *nag1* não apresentam aumento da transcrição do gene da quitinase *ech42* em condições normais de indução. Além disso, a atividade de quitinase em sobrenadantes de cultivos induzidos para a produção de quitinases diminuiu até 80 vezes (BRUNNER et al., 2003). O próprio gene *nag1* tem sua expressão modulada por sinais típicos da regulação de quitinases, sendo induzido por quitina e oligômeros de GlcNAc (MACH et al., 1999). A habilidade micoparasitária da linhagem Δ *nag1* foi similar a da linhagem selvagem em testes de confronto em placa contra fungo fitopatogênico (BRUNNER et al., 2003), e nenhuma mudança fenotípica ou alteração do micoparasitismo foi detectada em uma linhagem de *T. asperellum* como o gene *exc2y* deletado (sendo *exc2y* equivalente à *nag2*) (RAMOT et al., 2004).

A participação de NAGases na degradação da parede celular durante a autólise celular em culturas de fungos foi descrita em *Penicillium chrysogenum*, e o gene responsável, *nagA*, foi clonado e caracterizado (PUSZTAHELYI et al., 1997; DÍEZ et al., 2005). O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* possui somente um gene codificando NAGase, *nagA*, e este gene também é fortemente induzido durante autólise (PUSZTAHELYI et al., 2006; SHIN et al., 2009). A disrupção do gene *nagA*, também de *A. nidulans*, impede seu crescimento em meio contendo quitobiose como única fonte de carbono, mas nenhuma alteração fenotípica é detectada em meio contendo glicose. Estes dados sugerem que *nagA* não é essencial para o fungo crescido em meio contendo fontes de carbono facilmente metabolizadas, mas sim para assimilar fontes de carbono a partir da degradação da quitina (KIM et al., 2002).

Ainda há uma grande lacuna no entendimento da relevância fisiológica das NAGases em fungos, principalmente tratando-se de fungos entomopatogênicos. É preciso

ampliar o conhecimento sobre o quanto NAGases são realmente importantes para diversos processos quitinolíticos, seu envolvimento no remodelamento da parede celular, diferenciação em tipos celulares do ciclo de vida de *M. anisopliae*, mecanismos de ataque e defesa (por exemplo, entomopatogenicidade) e/ou seriam somente importantes para o sequestro de quitina, independentemente da fonte de carbono a ser utilizada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genômica e funcional das β -N-acetilglicosaminidases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prospectar, identificar e caracterizar os genes de NAGases no genoma de *M. anisopliae*;
- Realizar a predição da localização celular e de propriedades físico-químicas das proteínas das NAGases preditas;
- Analisar as relações evolutivas existentes entre as NAGases de *M. anisopliae*;
- Analisar o padrão transcricional dos genes de NAGases em diferentes fontes nutricionais e tipos celulares de *M. anisopliae*;
- Construir mutantes funcionais para as NAGases de *M. anisopliae* através de disrupção gênica.

Com o intuito de melhorar a apresentação dos experimentos realizados e organização dos resultados obtidos, esta Tese foi dividida em dois Capítulos: o Capítulo I trata da análise genômica e do perfil transcricional dos genes de NAGases das famílias 3 e 20 das glicosil hidrolases em *M. anisopliae*; o Capítulo 2 trata da construção de vetores para a geração de mutantes nulos e posterior análise funcional dos genes das NAGases de *M. anisopliae*.

4. CAPÍTULO I: Molecular evolution and transcriptional profile of GH3 and GH20 β -N-acetylglucosaminidases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.

Manuscrito aceito para publicação no periódico *Genetics and Molecular Biology* em 23 de fevereiro de 2018.

1 **Original Article**

2 **Title: Molecular evolution and transcriptional profile of GH3 and GH20 β -N-**
3 **acetylglucosaminidases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.**

4

5 **Authors and Affiliations:** Eder Silva de Oliveira, Ângela Junges, Nicolau Sbaraini, Fábio
6 Carrer Andreis, Claudia Elizabeth Thompson, Charley Christian Staats, Augusto Schrank.

7 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
8 Brazil.

9

10 **Short running title:** *M. anisopliae* GH3 and GH20 NAGases

11

12 **Keywords:** NAGases; GH20; GH3; *Metarhizium*; chitinolytic system;
13 entomopathogenesis

14

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

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

18 Fax 55(51) 3308 -7309

19 E-mail: argusto@gmail.com

20 **Abstract**

21 Cell walls are involved in manifold aspects of fungi maintenance. For several fungi, chitin
22 synthesis, degradation and recycling are essential processes required for cell wall
23 biogenesis; notably, the activity of β -N-acetylglucosaminidases (NAGases) must be
24 present for chitin utilization. For entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium anisopliae*,
25 chitin degradation is also used to breach the host cuticle during infection. In view of the
26 putative role of NAGases as virulence factors, this study explored the transcriptional
27 profile and evolution of putative GH20 NAGases (*MaNAG1* and *MaNAG2*) and GH3
28 NAGases (*MaNAG3* and *MaNAG4*) identified in *M. anisopliae*. While *MaNAG2* orthologs
29 are conserved in several ascomycetes, *MaNAG1* clusters only with *Aspergillus* sp. and
30 entomopathogenic fungal species. By contrast, *MaNAG3* and *MaNAG4* were
31 phylogenetically related with bacterial GH3 NAGases. The transcriptional profiles of *M.*
32 *anisopliae* NAGase genes were evaluated in seven culture conditions showing no common
33 regulatory patterns, suggesting that these enzymes may have specific roles during the
34 *Metarhizium* life cycle. Moreover, the expression of *MaNAG3* and *MaNAG4* regulated by
35 chitinous substrates is the first evidence of the involvement of putative GH3 NAGases in
36 physiological cell processes in entomopathogens, indicating their potential influence on
37 cell differentiation during the *M. anisopliae* life cycle.

38 1. Introduction

39 Chitin is the second most abundant polymer on Earth and its recycling from
40 carapaces, cuticles and fungal cell walls impacts on carbon and nitrogen cycles. The chitin
41 polymer is composed of β -1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) subunits (Beier
42 and Bertilsson, 2013) and its degradation can be driven in two ways: i) chitin can be
43 deacetylated to chitosan by action of chitin deacetylases (EC 3.5.1.41), which yields
44 glucosamine monomers via the enzymatic hydrolysis by chitosanase (EC 3.2.1.132); or ii)
45 by the chitinolytic degradation process generating GlcNAc monomers, which involves the
46 initial hydrolysis of the β -1,4 glycoside bonds by the action of a group of enzymes,
47 including chitinases (EC 3.2.1.14), lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) (of the
48 auxiliary activity 10 family - AA10; EC N/A) and β -N-acetylglucosaminidases (NAGases;
49 EC 3.2.1.52) (Beier and Bertilsson, 2013; Thorat *et al.*, 2017). The enzymes enrolled in the
50 chitinolytic degradation process act in a consecutive fashion to completely degrade chitin
51 (Patil *et al.*, 2000; Hartl *et al.*, 2012; Brzezinska *et al.*, 2014). LPMOs and endo-acting
52 GH18 chitinases insert strand breaks at random positions within the chitin polymer, while
53 exo-acting GH18 chitinases subsequently cleave chito-oligosaccharides (Chavan and
54 Deshpande, 2013; Langner and Göhre, 2015). Finally, NAGases hydrolyze β -1,4 linkages
55 on N-acetylglucosamine dimers (chitobiose), producing GlcNAc monosaccharides (Duo-
56 Chuan, 2006).

57 NAGases are classified into three glycoside hydrolase (GH) families, 3, 20, and 84,
58 on the basis of their amino acid sequence similarities (Cantarel *et al.*, 2009). GH3 and
59 GH84 NAGases are distributed in several bacterial and metazoan cells, respectively, while
60 members from the GH20 family are versatile enzymes abundant in fungi and insects.
61 Although these three families encompass functionally related enzymes, they possess no

62 sequence homology, differing in their structure and catalytic mechanism (Slámová *et al.*,
63 2010; Liu *et al.*, 2012).

64 The genomes of ascomycetous filamentous fungi contain, on average, 15 to 25
65 chitinase-encoding genes, but only one or two genes encoding GH20 NAGases (Seidl,
66 2008; Junges *et al.*, 2014). Notably, as has been shown for the mycopathogenic fungus
67 *Trichoderma atroviride*, chitin could not be used as a nutrient source if NAGase activity is
68 absent, despite the presence of approximately 30 chitinase genes, emphasizing the
69 importance of these enzymes for the full degradation of the chitin polymer (López-
70 Mondéjar *et al.*, 2009). In this way, the diversity of chitinase genes contrasts with the
71 relatively low number of NAGase genes and their fundamental importance on chitin
72 metabolism.

73 Potential functions for NAGases in fungi include the use of exogenous chitin as a
74 nutrient source and cell wall turnover during the fungal life cycle (Seidl *et al.*, 2006).
75 These functions have already been described for GH20 NAGases in *T. atroviride* (Seidl *et*
76 *al.*, 2006; López-Mondéjar *et al.*, 2009), *Aspergillus* sp. (Kim *et al.*, 2002), and
77 *Neurospora crassa* (Tzelepis *et al.*, 2012). In addition, GH20 NAGases participate in
78 processes related to fungal hyphal extension and branching (Rast *et al.*, 1991), fungal cell
79 wall degradation during autolysis (Díez *et al.*, 2005), and have a putative role in insect
80 pathogenesis (St. Leger *et al.*, 1991).

81 In contrast, NAGases belonging to the GH3 family consist of a small group of
82 bacterial enzymes that possess a broad range of functions depending on the organism.
83 Similarly to GH20 NAGases, some GH3 NAGases participate in chitin catabolism, as in
84 marine chitinolytic bacteria, such as *Vibrio furnissii* and *Alteromonas* sp. (Tsujiibo *et al.*,
85 1994; Chitlaru and Roseman, 1996). Notably, only recently, the first fungal GH3 NAGase

86 was described (Yang *et al.*, 2014). The RmNag enzyme from the zygomycete *Rhizomucor*
87 *miehei* exhibited hydrolysis activity on N-acetylchitooligosaccharide (GlcNAc)₂₋₃
88 substrates. This report further supports the existence of GH3 NAGases in other fungal
89 species, especially in ascomycetes, considering their expansion of chitinolytic machinery
90 genes (Seidl 2008; Junges *et al.*, 2014).

91 In recent years the chitin degradation machinery has attracted much attention,
92 especially in entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:
93 Clavicipitaceae). In these species, the chitinolytic system has, probably, two main
94 biological functions: Firstly, as chitin is the major component of fungal cell walls, chitin-
95 degrading enzymes act on the cell wall remodeling, which is necessary for hyphal
96 vegetative growth (Seidl, 2008). Secondly, the infection of arthropod hosts requires a prior
97 chitin hydrolysis of the exoskeleton (St. Leger *et al.*, 1991). Furthermore, *M. anisopliae*
98 has the ability to differentiate into specialized cell types during its infection cycle. The
99 switch between conidia to hyphae and the formation of infection structures (i.e.,
100 appressorium and blastospore), are processes that require chitin degradation (Schrank and
101 Vainstein, 2010). Notably, the importance of some *M. anisopliae* chitinase genes in
102 infection process have been suggested and functionally verified using knockout
103 constructions (da Silva *et al.* 2005; Boldo *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2013).

104 Despite the knowledge gained by the study of chitinases in *Metarhizium*, the role of
105 NAGases in entomopathogens' life cycle and infection process has not been fully
106 elucidated. This study surveyed putative NAGase genes from GH3 and GH20 families in
107 *M. anisopliae* and investigated their evolutionary relationships to those of other
108 filamentous ascomycetes. To further characterize NAGase genes in *M. anisopliae*, their
109 expression patterns were evaluated in different cell types and various nutritional

110 conditions. The results suggest new possibilities for studying NAGases participation in *M.*
111 *anisopliae* biology.

112

113 **2. Material and Methods**

114 **2.1. NAGase gene mining of the *M. anisopliae* genome**

115 The survey of NAGase genes was performed in the *M. anisopliae* E6 genome
116 assembly (accession number PRJNA245858) (Staats *et al.*, 2014). In order to identify
117 putative GH20 NAGase genes, three well described NAGase sequences of filamentous
118 fungi were used as the query in a tBLASTn search: NagA from *A. nidulans* (XP_659106)
119 (Kim *et al.*, 2002), and Nag1 and Nag2 from *T. atroviride* (EHK40646 and EHK46127)
120 (Brunner *et al.*, 2003; López-Mondéjar *et al.*, 2009). Further screening was performed
121 using the conserved GH20 domain sequence found in GH20 hexosaminidases
122 (InterProScan IPR015883) as the query. To identify *M. anisopliae* putative NAGases of the
123 GH3 family, the NagA protein sequence from the bacteria *Streptomyces thermoviolaceus*
124 OPC-520 (BAA32403) was used as a query in the tBLASTn search (Tsujiibo *et al.*, 1998).
125 Additionally, the GH3 RmNag sequence from the zygomycete *R. miehei* CAU-432
126 (AGC24356), the only fungal GH3 family member with NAGase activity to date (Yang *et*
127 *al.*, 2014), was also used a query. Further screening was performed using the conserved
128 GH3 domain sequence from GH3 hexosaminidases (InterProScan IPR001764) as a query.
129 All NAGase sequences were extracted from the BROAD Institute and NCBI databases.

130 Each identified NAGase sequence was applied to search for similarity on *M.*
131 *anisopliae* contigs employing the tBLASTn algorithm in the BioEdit software (Hall, 1999).
132 The positive NAGase containing contigs were screened for GH20 and GH3 family
133 domains. The same screening methodology was applied using the conserved sequence

134 motif from GH20 NAGases (H/N-x-G-A/C/G/M-D-E-A/I/L/V) (Slámová *et al.*, 2010) and
135 the conserved motif from GH3 NAGases (K-H-F/I-P-G-H/L-G-x-x-x-x-D-S/T-H) (Mayer
136 *et al.*, 2006).

137 **2.2. NAGase sequence analyses**

138 To further confirm and analyze the specific GH20 and GH3 NAGases domains
139 identified by the *in silico* survey, the predicted sequences were compared with sequences
140 deposited on InterProScan (Zdobnov and Apweiler, 2001), dbCAN (Yin *et al.*, 2012) and
141 CDD (Conserved Domain database) databases (Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Additionally,
142 BLASTx and manual inspection (search for canonical 5' and 3' splice sites) was employed
143 to predict and compare the number and position of introns between *M. anisopliae* putative
144 NAGase gene sequences and public NAGase sequences. Theoretical isoelectric points and
145 molecular mass values were obtained from Compute pI/Mw tool (Bjellqvist *et al.*, 1993;
146 Bjellqvist *et al.*, 1994). Transmembrane domains were investigated by TMHMM v.2.0
147 (Krogh *et al.*, 2001). Theoretical signal peptide cleavage site was analyzed by the SignalP
148 4.1 server (Petersen *et al.*, 2011). GPI-anchoring signals were predicted by the big-PI
149 Fungal Predictor software (Eisenhaber *et al.*, 2004). Non-classical secretion pathway
150 prediction was evaluated by the SecretomeP server 2.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) and the
151 number of N-glycosylation sites was predicted by the GlycoEP Predictor (Chauhan *et al.*,
152 2013).

153 **2.3. NAGase protein phylogeny**

154 *M. anisopliae* putative GH20 and GH3 NAGase sequences were employed to
155 identify ortholog sequences in fifteen filamentous fungi species (**Table 1**). RmNAG of the
156 zygomycete *R. miehei* and ten well described bacterial GH3 NAGases were added to the
157 phylogenetic analysis of GH3 NAGases. Additionally, *M. anisopliae* β -glucosidases,

158 characterized fungal β -glucosidases and putative β -glucosidases from species described in
159 **Table 1**, were used as outgroup for the phylogenetic analysis.

160 Only fungal sequences were used for the inference of the phylogenetic tree of
161 GH20 NAGases, since alignment errors are more frequent when divergent sequences are
162 included in the analysis. The amino acid alignments were built and trimmed with
163 GUIDANCE2 (Sela *et al.*, 2015) using PRANK (Löytynoja and Goldman, 2010) as a MSA
164 algorithm with 100 bootstrap replicates and the additional default parameters. The cut-off
165 score for filtering unreliably aligned amino acids was chosen to be 0.60, after the multiple
166 alignments were manually checked. The best-fit evolutionary model was evaluated using
167 ProtTest 3.4 (Darriba *et al.*, 2011). The MrBayes 3.2.5 (Ronquist *et al.*, 2012) and PhyML
168 3.1 (Guindon *et al.*, 2010) were used to infer the GH3 and GH20 NAGase phylogenetic
169 trees using Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML), respectively. Four
170 chains were run for 1,000,000 generations, sampled every 100 steps, with an average
171 standard deviation of split frequencies < 0.01 as convergence criterion and 25% of
172 genealogies discarded as burn-in in the BI analysis. In the ML analysis, a fast approximate
173 likelihood ratio test (aLRT) was used for determining the branch support, which is a an
174 appropriate alternative for the computationally demanding bootstrap analysis (Anisimova
175 and Gascuel 2006; Anisimova *et al.*, 2011).

176 **2.4. Fungal strain and culture conditions**

177 *Metarhizium anisopliae* E6 strain was isolated from the insect *Deois flavopicta* in
178 Brazil. Conidia were collected from agar plate cultures and filtered with glass wool to
179 remove the mycelium. *M. anisopliae* conidial suspensions (1×10^6 conidia/mL) were
180 cultured under seven different growth conditions prior to RNA extraction: **i) Cove's**
181 **Complete medium (MCc)** containing (w/v) 1% glucose, 0.6% NaNO₃, 0.15% casein

182 hydrolysate, 0.05% yeast extract, 0.2% peptone, pH 7.0 plus 2% (v/v) salts solution [2.6%
183 KCl, 2.6% MgSO₄·7H₂O and 7.6% KH₂PO₄ (w/v)] and 0.04% (v/v) Trace Elements
184 Solution [0.04% Na₂Ba₄O₇·7H₂O, 0.4% CuSO₄·5H₂O, 0.01% FeSO₄, 0.8%
185 Na₂MNO₄·7H₂O, 0.8% MnSO₄·7H₂O and 0.8% ZnSO₄·7H₂O (w/v)] (Pinto *et al.*, 1997); **ii)**
186 **0.25% GlcNAc** in minimum medium composed of 0.6% NaNO₃ (w/v) plus 0.25%
187 NGlcNAc) (w/v) as carbohydrate source, with salts and trace element solutions (Junges *et*
188 *al.*, 2014); **iii) 1% Chitin** in minimum medium composed of 0.6% NaNO₃ (w/v) plus 1%
189 crystalline chitin from crab shells as a carbohydrate source, with salts and trace element
190 solutions (Junges *et al.*, 2014). *M. anisopliae* cultures i, ii and iii were maintained on
191 shaker (180 rpm) for 72 h at 28°C, then washed with sterile distilled water and filtered
192 through *Mira cloth* and frozen in liquid nitrogen for total RNA extraction; **iv) Autolysis:**
193 medium for mycelium autolysis induction (1% glucose (w/v) and 0.6% NaNO₃ (w/v),
194 sustained for 9 days) (Junges *et al.*, 2014; Kappel *et al.*, 2016); **v) Sporulation:** on MCC
195 agar plates for conidia RNA extraction; **vi) Blastospores:** Inoculation of 5×10⁴ conidia/mL
196 on ADAMEK medium for blastospore production [3% corn steep solids, 4% glucose and
197 3% yeast extract (w/v)], shaking for 64 h at 28°C (Adamek, 1965); **vii) Appressorium**
198 **induction medium:** 5×10⁵ conidia/mL was inoculated in 0.004% yeast extract solution on
199 500 glass coverslips for 16 hours at 28°C (Junges *et al.*, 2014). Blastospore and
200 appressorium induction were confirmed by microscopic observation of randomly selected
201 coverslips (**Fig. S3**).

202 **2.5. RNA sample preparation**

203 Total RNA extraction from *M. anisopliae* cells harvested under all seven different
204 growth conditions was performed in triplicate. Samples were ground using a mortar and
205 pestle in liquid nitrogen, prior to standard RNA extraction using Trizol Reagent (Life

206 Technologies, Grand Island, NY, USA). Residual DNA was removed with DNase (Thermo
207 Scientific, MA, USA), thereafter, extractions were passed through RNeasy Cleanup
208 columns (Qiagen, Hilden, Germany). RNA samples were quantified using a Qubit
209 fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and stored at -80°C. One µg of
210 total RNA was used for cDNA synthesis using MMLV-RT enzyme (Life Technologies,
211 Grand Island, NY, USA). All procedures were performed according to the manufacturer's
212 instructions.

213 **2.6. Quantitative PCR (qPCR) experiments**

214 Polymerase chain reactions were carried out on ABI-7500 Real-Time PCR System
215 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-
216 UDG (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) was used to monitor dsDNA synthesis.
217 Each biological sample was analyzed in technical triplicates; no-template and no-reverse
218 transcriptase controls were included.

219 Primers for qPCR assays were designed using VECTOR NTI software (Thermo
220 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (**Table S1**). Five housekeeping genes were
221 evaluated: *act* (γ -actin), *gapdh* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *tefl- α*
222 (translation elongation factor 1- α), *trpI* (tryptophan biosynthesis enzyme), and *tub* (α -
223 tubulin). The efficiency of each reference gene expression through samples was analyzed
224 using *geNorm* version 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002) and *NormFinder* (Andersen *et al.*,
225 2004). The best reference gene identified by both analyses for the samples tested was *tefl- α*
226 *α* , which was used in all qPCR assays (**Table S1**).

227 Melting curves from each qPCR reaction were analyzed to confirm specificity of
228 the synthesized products and absence of primer dimers. Relative transcript expressions
229 were analyzed by Cq (quantification cycle) values, applying the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and

230 Schmittgen, 2001). Results were processed in GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) for
231 graphics and statistical data acquisition. One-way analysis of variance (ANOVA), followed
232 by Tukey's multiple comparisons test ($P < 0.05$) were performed to determine statistical
233 differences among $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values of the seven experimental conditions.

234

235 3. Results

236 3.1. *M. anisopliae* putative GH20 and GH3 NAGases

237 The survey of NAGase genes of the *M. anisopliae* genome, using NagA from *A.*
238 *nidulans* and NAG1 and NAG2 from *T. atroviride* as queries, resulted in the identification
239 of two putative GH20 NAGases, named MaNAG1 (MANI_010908; GenBank accession
240 number KFG80340) and MaNAG2 (MANI_029504; GenBank accession number
241 KFG85702). All other fungal GH20 NAGase sequences and GH20 conserved domain
242 sequences used as queries resulted in alignments with the same two previously detected
243 contigs. Therefore, MaNAG1 and MaNAG2 are most probably the only *M. anisopliae*
244 putative GH20 NAGases. The GH20 family domain (IPR015883) and the conserved motif
245 of GH20 proteins (H/N-x-G-A/C/G/M-D-E-A/I/L/V) were found in both MaNAG1 and
246 MaNAG2 sequences (**Fig. S1**). Additionally, the putative GH20 NAGases also exhibited a
247 chitinase/beta-hexosaminidase N-terminal domain (IPR029018) (**Fig. 1**).

248 The GH3 domain screening of the *M. anisopliae* genome allowed the identification
249 of seven positive matches. However, phylogenetic analysis clearly revealed that only two
250 sequences, named MaNAG3 (MANI_122030; GenBank accession number KFG78085)
251 and MaNAG4 [MANI_128875; (**Fig. S4**)] could be putative GH3 NAGases. Furthermore,
252 these sequences exhibit higher similarity with bacterial GH3 NAGases and the RmNag
253 GH3 (**Fig. S2**). MaNAG3 and MaNAG4 share a conserved domain with GH3 family

254 members (IPR001764) and exhibit the conserved sequence motif of GH3 proteins (K-H-
255 F/I-P-G-H/L-G-x-x-x-x-D-S/T-H) (**Fig. S2**). Furthermore, MaNAG3 and MaNAG4
256 sequences present a conserved GH3 C-terminal domain (IPR002772) (**Fig. 1**). The other
257 five putative GH3 proteins (KFG84234, KFG86760, KFG85258, KFG81708, and
258 KFG84481) display higher sequence conservation and are phylogenetic related with fungal
259 β -glucosidases (**Fig.3 and Fig. S2**), raising the possibility of functional equivalence.

260 All properties of the proposed *M. anisopliae* putative NAGases are listed in **Table**
261 **2**. Putative GH20 NAGase genes have similar ORF sizes and exhibit no intron
262 conservation between sequences. While MaNAG1 does not show any intron insertions,
263 MaNAG2 sequence has two intron insertions (**Fig. 1**). The predicted molecular masses for
264 MaNAG1 and MaNAG2 (66.98 kDa and 61.42 kDa, respectively) are similar to other
265 fungal GH20 NAGases, *A. nidulans* NagA (68 kDa) (Kim *et al.*, 2002), *T. atroviride* Nag1
266 (73 kDa) (Brunner *et al.*, 2003) and *T. harzianum* P1 Nag1 (72 kDa) (Peterbauer *et al.*,
267 1996). The theoretical pI of *M. anisopliae* GH20 NAGases predicts that they are acidic
268 enzymes, with MaNAG2 exhibiting a more acidic pI than MaNAG1, 4.85 and 6.07,
269 respectively. Both putative GH20 NAGases have the same four N-glycosylation sites.
270 Putative GH3 NAGase genes exhibit different physicochemical properties. MaNAG3 is the
271 largest gene (3,223 bp), containing the highest expected number of introns (4) and
272 theoretical molecular mass (98.71 kDa), with N-glycosylation translational modification
273 signals on six sites. In contrast, MaNAG4 ORF size is 2,057 bp, the theoretical molecular
274 mass is 60.67 kDa and the pI of predicted mature protein is 5.6. The predicted molecular
275 mass of MaNAG4 is similar to most known bacterial GH3 NAGases, as *S.*
276 *thermoviolaceus* NagA (60 kDa) (Tsujiibo *et al.*, 1998). None of the putative NAGase
277 protein sequences contain GPI-anchoring sites or non-classical secretion pathway

278 prediction signals. Interestingly, both MaNAG1 and MaNAG2 have predicted secretion
279 signal peptides, from which extracellular functions can be inferred. In contrast, putative
280 GH3 NAGases are apparently cytoplasmic enzymes, since they do not present any
281 predicted secretion signals.

282 **3.2. Phylogeny of putative GH20 NAGases**

283 Twenty-six MaNAG1 and MaNAG2 orthologs were identified in fifteen
284 filamentous fungi genomes. Most of them are single copy of each putative GH20 NAGase
285 of *M. anisopliae*. The conserved motif of GH20 proteins and the highly conserved catalytic
286 residues, aspartic and glutamic acids (D-E), were recognized in all of GH20 orthologs (**Fig.**
287 **S1**).

288 The best-fit evolutionary model for GH20 NAGases was LG+I+G, which was used
289 for the phylogenetic inference. Phylogenetic analyses of GH20 NAGases from *M.*
290 *anisopliae* and the other fifteen ascomycetes revealed an early duplication event in GH20
291 NAGases, resulting in two distinct main clades (**Fig. 2**). MaNAG1 formed a monophyletic
292 group with other entomopathogenic fungi NAGase sequences (*Metarhizium robertsii*,
293 *Metarhizium acridum*, *Cordyceps militaris* and *Beauveria bassiana*). This cluster also
294 formed a statistically supported clade with species from the *Aspergillus* genus. In contrast,
295 MaNAG2 exhibit a more diverse evolutionary history, with orthologs present in
296 *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., and *Magnaporthe* sp. Interestingly, the
297 present evolutionary analysis revealed that both NAG1 and NAG2 from the mycoparasite
298 *T. atroviride*, used in the *M. anisopliae* genome screening, are evolutionarily more related
299 to MaNAG2 (**Fig. 2**).

300 For the majority of the fifteen fungi analyzed, only one ortholog to MaNAG1 and
301 one ortholog to MaNAG2 were detected in each species. Duplication events on a specific

302 lineage resulting in paralogous proteins was only observed for *Aspergillus niger*, which has
303 two MaNAG1 orthologs, and for *Nectria haematococca*, *N. crassa* and *Fusarium*
304 *graminearum*, with two MaNAG2 orthologs.

305 **3.3. Phylogeny of putative GH3 NAGases**

306 Twenty-three MaNAG3 and MaNAG4 orthologs were identified on the filamentous
307 fungi genomes examined. Conserved sequence motifs of GH3 proteins (K-H-F / I-P-G-H /
308 L-G-x-x-x-x-D-S / T-H) were found in all of them, however, few amino acid residues
309 substitutions were observed (**Fig. S2**). All fifteen filamentous fungi have MaNAG3
310 orthologs. However, the *M. acridum* gene ortholog was not included in the phylogenetic
311 analysis, since it was not properly annotated in the *M. acridum* genome. In turn, only
312 *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., and the entomopathogens *C. militaris* and *B. bassiana*
313 have MaNAG4 orthologs.

314 To better understand GH3 NAGases evolutionary relationships, ten well described
315 bacterial GH3 NAGases and the characterized GH3 NAGase from the zygomycete *R.*
316 *Miehei* (Yang *et al.*, 2014) were added to the phylogenetic analysis (**Table 1**). Since
317 several GH3 family fungal members with β -glucosidase activity have also been described
318 (Kawaguchi *et al.*, 1996; Krogh *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2012; Kudo *et al.*, 2015;
319 Zhao *et al.*, 2015; Colabardini *et al.*, 2016; Pei *et al.*, 2016), the phylogenetic relationships
320 among the fungal, bacterial, and *R. miehei* GH3 NAGases were inferred including as
321 outgroup putative β -glucosidases from *M. anisopliae* E6, characterized fungal β -
322 glucosidases and putative β -glucosidases from species described in **Table 1**. The best-fit
323 evolutionary model for GH3 NAGases was LG+I+G. The evolutionary relationship of all
324 GH3 proteins showed two distinct clades separating fungal and bacterial NAGases from β -
325 glucosidases (**Fig. 3**).

326 The phylogenetic tree revealed that MaNAG3 and MaNAG4 orthologs formed two
327 distinct clusters (**Fig. 3**). Both MaNAG3 and MaNAG4 grouped to other *Metarhizium*
328 species, but in contrast with the GH20 NAGases phylogeny, putative GH3 NAGases from
329 *Metarhizium* sp. are evolutionarily more distant from putative GH3 NAGases of other
330 entomopathogenic fungi (*B. bassiana* and *C. militaris*). Additionally, gene duplication of
331 MaNAG3 and MaNAG4 orthologs was not observed.

332 Bacterial sequences did not form a monophyletic group, but they are basal in
333 relation to fungal NAG3 and NAG4 (**Fig. 3**). The difference between bacterial NAGases
334 apparently is not related to gram-positive or gram-negative structural classification. It was
335 also observed that even bacterial NAGases with high chitinolytic substrate specificity (*S.*
336 *thermoviolaceus* NagA, *Clostridium paraputrificum* NagZ, *Alteromonas* sp. HexA, *V.*
337 *furnissii* NagZ, *Thermotoga maritima* NagA and *T. neapolitana* CbsA) grouped into
338 distinct clades from fungal NAGases. This is probably due to the fact that some bacterial
339 NAGases do not necessarily have GlcNAc hydrolysis specificity over
340 chitooligosaccharides. For example, *E. coli* NagZ cleaves GlcNAc from muropeptides
341 present in the bacterial cell wall (Cheng *et al.*, 2000). *C. fimi* Nag3 is also an unusual GH3
342 NAGase, because it is a β -N-acetylhexosaminidase with a wide range of substrates,
343 hydrolyzing both β -N-acetylglucosaminides and β -glucosides (Mayer *et al.*, 2006).

344 **3.4. Patterns of transcript relative expression of putative NAGases**

345 *M. anisopliae* putative NAGases expression profile was investigated in different
346 cell types under different culture conditions: mycelium grown on glucose 1%, GlcNAc
347 0.25%, chitin 1% or autolysis conditions; and induced conidia, blastospore and
348 appressorium. The four putative NAGase gene transcripts were detected in all *M.*

349 *anisopliae* cell types and culture conditions, validating the annotation of the proposed
350 genes.

351 To gain information on the regulation of the putative NAGases by substrate, the
352 transcript level of genes from *M. anisopliae* cultured in MCc medium was established as a
353 reference condition (**Fig. 4**). Interestingly, the expression of MaNAG1, MaNAG2 and
354 MaNAG4 were induced by 1% chitin, albeit at different levels (**Fig. 4**). Notably, MaNAG1
355 showed the most pronounced expression induction on this carbon source (**Fig. 4A**).
356 Additionally, MaNAG3 was the only MaNAGase induced in cultures with added 0.25%
357 GlcNAc (**Fig. 4C**). When different cellular types were taken into account, MaNAG3
358 exhibited detectable transcripts in cells forming appressorium, while MaNAG2 was
359 strongly induced in this cell type (**Fig. 4B**). The expression of the four putative NAGases
360 gene showed only basal levels in conidia and blastospores (**Fig. 4**). These results indicate
361 the minor participation of putative GH3 and GH20 in conidia and blastospores.

362

363 **4. Discussion**

364 Virulence determinants are the main focus in the study of entomopathogenic fungi
365 (Schrank and Vainstein, 2010). As chitin is present in the exoskeleton of several
366 arthropods, enzymes involved in chitin degradation and assimilation are predicted to play
367 essential roles in host-entomopathogen interactions (Schrank and Vainstein, 2010). While
368 chitinases are widely explored in entomopathogens and several fungal species with diverse
369 pathogenic traits, the role of NAGases in the fungal life cycle and their importance in
370 infection has not been explored. Here, four putative NAGase genes belonging to the GH20
371 family (*MaNAG1* and *MaNAG2*) and GH3 family (*MaNAG3* and *MaNAG4*) of *M.*
372 *anisopliae* genome were analyzed.

373 St. Leger and co-workers (1991) purified a secreted NAGase from *M. anisopliae* by
374 gel-filtration, with a pI of 6.4 and molecular mass of 110-120 kDa. We hypothesize that
375 this *M. anisopliae* purified enzyme could be the MaNAG1 presented here, due to the
376 predicted pI (6.07) and molecular mass (66.98 kDa) of MaNAG1, likely forming a
377 homodimer. In fact, some fungal GH20 NAGases (Koga *et al.*, 1991; Ryšlavá *et al.*, 2011)
378 and some bacterial GH3 NAGases (Choi *et al.*, 2009) exhibit a homodimer composition.
379 Nevertheless, the molecular characterization of *M. anisopliae* putative NAGases will be
380 necessary to determinate if the dimer structure is relevant to enzymatic activity.

381 Phylogenetic analyses of putative GH20 NAGases revealed the occurrence of at
382 least one duplication event before its divergence in fungi. This early gene duplication is
383 supported by evolutionary analysis of GH20 family from several eukaryotic taxa, reported
384 by Intra and co-workers (Intra *et al.*, 2008). Comparing the evolutionary history of
385 MaNAG1 and MaNAG2, subsequent duplication events resulted in current presence of
386 multiple GH20 NAGase orthologs in ascomycetes. This phenomenon was more frequent in
387 the MaNAG2 than MaNAG1 cluster, culminating in the presence of MaNAG2 orthologs in
388 a broader spectrum of fungi with different lifestyles. While MaNAG1 has orthologs only in
389 entomopathogens and in the saprophytic/human pathogens *Aspergillus* sp., MaNAG2
390 orthologs are present in entomopathogens, mycopathogen species such as *Trichoderma* sp.,
391 phytopathogens including *N. haematococca*, *Fusarium* sp. and *M. oryzae*, and in
392 saprophytes such as *N. crassa*. These species belong to distinct orders, however, a previous
393 study has observed their close evolutionary relationship (Wang *et al.*, 2009). The
394 widespread presence of MaNAG2 orthologs in fungi with diverse lifestyles could represent
395 a common basic function for all these enzymes despite their fungal lifestyle, while
396 MaNAG1 would have more specific roles in an entomopathogenic lifestyle.

397 In our analysis, *M. anisopliae* and *M. robertsii* formed a statistically well supported
398 clade, with *M. acridum* as a basal species, corroborating the phylogeny relationships
399 among these *Metarhizium* species (Bischoff *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2014). Our results
400 revealed a close evolutionary relationship of GH20 NAGases between the *Metarhizium*
401 clade and the one formed by *Beauveria* and *Cordyceps* genera. The conservation of
402 secreted proteins in fungi has been observed among *M. anisopliae* and entomopathogens
403 *Metarhizium* spp., *B. bassiana* and *C. militaris* (Staats *et al.*, 2014). Therefore, the
404 evolutionary pattern of GH20 NAGases in entomopathogens is representative of the
405 extremely similar evolutionary pattern of all secreted proteins found in fungi with similar
406 hosts.

407 The glycoside hydrolases from the CAZy family GH3 display an unusual diversity
408 in structure, specificity, and biological roles (Macdonald *et al.*, 2015). In many cases the
409 enzymes have dual or broad substrate specificities with respect to monosaccharide
410 residues, linkage position and chain length of the substrate. This family harbors members
411 with several activities, most notably β -glucosidases and NAGases (Macdonald *et al.*,
412 2015). Several fungal β -glucosidases from the GH3 family have been characterized
413 (Kawaguchi *et al.*, 1996; Krogh *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2012; Kudo *et al.*, 2015;
414 Zhao *et al.*, 2015; Colabardini *et al.*, 2016; Pei *et al.*, 2016), however the first fungal
415 NAGase from family GH3 was only recently described (RmNag) (Yang *et al.*, 2014). The
416 first goal of our phylogenetic analyses was to clearly distinguish putative NAGases from
417 putative β -glucosidases. The phylogenetic analysis set apart putative GH3 NAGases from
418 putative GH3 β -glucosidases (**Fig. 3**), suggesting GH3 NAGase activity for MaNAG3 and
419 MaNAG4. Indeed, the characterized RmNag clustered together with MaNAG3 and
420 MaNAG4 having robust support, suggesting the possibility of similar functions of these

enzymes (**Fig. 3**). The five other putative GH3 proteins from *M. anisopliae* (KFG84234, KFG86760, KFG85258, KFG81708, and KFG84481) clustered together with characterized β -glucosidases, again suggesting the possibility of similar function (**Fig. 3**). Additionally, several characterized bacterial GH3 NAGases were more phylogenetically related with MaNAG3, MaNAG4 and RmNag than with the characterized β -glucosidases (**Fig. 3**). Bacterial NAGases were added to phylogenetic analyses, which show well-established acetyl-chitooligosaccharide degradation activity, and NAGases with other substrate specificities, such as NagZ from *E. coli* and NAG3 from *C. fimi*. *E. coli* NagZ participates in bacteria cell wall recycling by hydrolyzing GlcNAc from muropeptides (Cheng *et al.*, 2000). In turn, *C. fimi* NAG3 was identified as a bifunctional β -N-acetyl-D-glucosaminidase/ β -D-glucosidase (Mayer *et al.*, 2006). It was also reported that *C. fimi* NAG3 enzyme is actually a GlcNAc-phosphorylase using phosphate rather than water as nucleophile (Macdonald *et al.*, 2015). Macdonald's study suggests that other GH3 NAGases can harbor GlcNAc-phosphorylase activity. Notably, our GH3 phylogenetic analysis showed that *C. fimi* NAG3 has a basal position in relation to other bacterial and fungal NAGases with chitin specificity, supporting this suggestion. However, complementary experiments are required to evaluate this putative GlcNAc-phosphorylase activity.

The phylogenetic analysis of putative GH3 NAGases suggests an early acquisition of GH3 NAGases in fungi, indicating that the observed diversity resulted from ancient duplications that occurred after the divergence between bacteria and the fungi GH3 family genes (**Fig. 3**). Fungal orthologs of MaNAG3 and MaNAG4 formed two distinct clades. In relation to the NAG4 clade, MaNAG4 was arranged closer to GH3 NAGases of the mycoparasitic *Trichoderma* sp. than orthologs of entomopathogenic species *C. militaris*

445 and *B. bassiana*. The NAG3 from entomopathogens formed a monophyletic group with
446 *Trichoderma* species, with MaNAG3 basal to them. It seems that *M. anisopliae* GH3
447 NAGases may not have specific roles in entomopathogenic fungal lifestyle. However, at
448 this point, their participation in basal cell processes cannot be ruled out, such as GlcNAc
449 carbon metabolism and cell wall remodeling, both processes necessary to hyphal growth
450 and cell differentiation.

451 The qPCR assays of putative GH20 and GH3 NAGase genes confirmed that the
452 identified sequences are functional. *M. anisopliae* putative NAGases showed differential
453 transcript profiles in response to different conditions, indicating an absence of a common
454 gene regulation pattern. These variable expression profiles also suggest they may not have
455 totally redundant roles. *M. anisopliae* GH20 NAGases, *MaNAG1* and *MaNAG2*, exhibited
456 induced expression patterns when cultured in the presence of 1% chitin. Our results reflect
457 the well-established condition where chitin induces the expression of secreted chitinolytic
458 enzymes (St. Leger *et al.*, 1991; Seidl, 2008). The presence of a predicted signal peptide
459 for secretion in MaNAG1 and MaNAG2, and their expression induction by chitin reveal
460 their probable role in extracellular chitinolytic activity in *M. anisopliae*, acting on
461 extracellular cleavage of chitobiose into GlcNAc monomers for the assimilation of this
462 carbon source. Although, it is important to note that other carbon sources are also able to
463 stimulate, at lower levels, the expression of GH20 NAGases (Seidl *et al.*, 2006).

464 The expression profile of *M. anisopliae* putative NAGases in appressorium is
465 noteworthy. MaNAG2 was the most significantly expressed NAGase in appressorium,
466 being highly induced in this cell type. The appressorium is a specialized penetration
467 structure that helps to dissolve the host chitinous exoskeleton. These cells use enzyme
468 secretion and physical pressure to mediate penetration. Therefore, it can be suggested that

469 MaNAG2 is putatively required at early stages of infection, during the penetration stage or
470 to remodel the fungal cell wall in appressorium differentiation.

471 It was expected that 0.25% GlcNAc would induce *M. anisopliae* NAGases, because
472 this low concentration of GlcNAc is described as an inducer for chitinolytic genes and only
473 high monomer concentrations (> 0.5%) would repress expression of chitinolytic enzymes
474 by their own activity products in *M. anisopliae* (catabolic repression) (Barreto *et al.*, 2004).
475 Similarly, *T. atroviride nag1* expression is induced by GlcNAc (Mach *et al.*, 1999).
476 However, the transcript expression analysis showed that *M. anisopliae* putative GH20
477 NAGases were not induced by GlcNAc. MaNAG3 was the only putative NAGase induced
478 by 0.25% GlcNAc and the only putative NAGase that was not induced by 1% chitin
479 suggesting a possible regulatory mechanism for this gene, in which the expression could
480 depend on the prior degradation of chitin to GlcNAc. Furthermore, no transcript induction
481 of any NAGases was observed in blastospores and conidia (**Fig. 4**), which are cellular
482 forms with diminished metabolic activity, although not completely dormant (Novodvorska
483 *et al.*, 2016). In addition, *M. anisopliae* conidial extracts and immunoproteomic analysis
484 indicate that chitinases may be localized on the conidial surface (Santi *et al.*, 2009; Santi *et*
485 *al.*, 2010), NAGase activity is probably not necessary in these resting cells. In contrast,
486 blastospores are cell types that facilitate dispersal in host hemolymph during colonization.
487 At this stage, the fungus has already transposed the chitinous exoskeleton and uses
488 trehalose and other carbon sources, not requiring, necessarily, the expression of chitinolytic
489 enzymes (Xia *et al.*, 2002). Nevertheless, it is important to note that the ADAMEK media
490 used to induce blastospores does not fully mimic the arthropod inner body complexity, and
491 GH3 and GH20 NAGase activity may be required in specific steps of blastospore
492 differentiation and infection.

493 Chitinases and NAGases act consecutively and synergistically to render complete
494 degradation of chitin. This may be the result of common regulation patterns between these
495 two groups of enzymes, as revealed in *T. atroviride* NAGase studies (Tharanathan and
496 Kittur, 2003). The experimental conditions used in this study for the evaluation of *M.*
497 *anisopliae* putative NAGase expression were the same employed for the study of the 21
498 chitinases from *M. anisopliae* (Junges *et al.*, 2014). This allowed the comparison of the
499 performance of different genes of the chitinolytic process to propose potential relationships
500 between specific chitinases and NAGases. Junges and co-workers (2014) described a large
501 group of chitinases induced by chitin: *chimaA1*, *chimaA6*, *chimaA8*, *chimaB1*, *chimaB2*,
502 *chimaB3*, *chimaB4*, *chimaB6*, *chimaC3*. This expression pattern can be associated with
503 *MaNAG1*, *MaNAG2* and *MaNAG4* that also displayed increased expression profile in the
504 presence of chitin. Also, those putative NAGases induced by chitin could be followed by
505 chitinase action induced by GlcNAc monomers (*chimaD1*) (Junges *et al.*, 2014). On media
506 supplemented with the GlcNAc monomer, the *MaNAG3* gene showed strong expression
507 when compared to the other *M. anisopliae* putative NAGases, coinciding with the *chimaD1*
508 chitinase pattern. Moreover, in the induced apressorium formation condition, the
509 expression of *MaNAG2* could be related to *chimaA5* chitinase, since both are
510 overexpressed in this cellular type.

511 Our results are in agreement to previous suggestions of the presence of GH3
512 NAGases in fungi (RmNag) (Yang *et al.*, 2014) and in the Hypocreales order (Kappel *et*
513 *al.*, 2016). In fact, Kappel and co-workers (2016) have functionally characterized a GH3
514 gene (named *nag3*; XP006966911) in *T. reesei*, the product of which, an *MaNAG3*
515 ortholog, holds suggested NAGase activity (Kappel *et al.*, 2016). The phylogenetic
516 analyses indicate that *MaNAG3* and *T. reesei* NAG3 are phylogenetically related (**Fig. 3**).

517 The existence of more putative NAGase genes argues that the genomic arsenal of
518 NAGases in ascomycetes is not as small as previously thought, attenuating the discrepancy
519 between the number of chitinase and NAGase genes. It is also not possible to rule out the
520 existence of other unknown NAGases in *M. anisopliae* and other fungal species. In this
521 sense, we have identified a fifth and unexplored putative NAGase gene in *M. anisopliae*,
522 belonging to the GH84 family. The product of this gene (KFG85933.1) exhibits 63%
523 identity with characterized GH84 from *Penicillium chrysogenum* (XP_002557703.1). The
524 *P. chrysogenum* GH84 NAGase not only exhibits activity against GlcNAc substrates, but
525 also hydrolyzes substrates with *galacto*-configuration and exhibits transglycosylation
526 activity (Slámová *et al.*, 2014).

527 In conclusion, this study explored relevant evolutionary aspects of putative GH3
528 and GH20 NAGase genes and the expression analysis highlighted possible functions for
529 these genes in *M. anisopliae* and entomopathogenic fungi. This analysis will allow the
530 selection of genes for further functional characterization to elucidate the process and to
531 identify redundancies and specificities. The view that chitinase diversity is merely
532 redundant may not be the case (Seidl *et al.*, 2005; Tzelepis *et al.* 2012; Junges *et al.*, 2014).
533 However, the strategy of constructing deleted strains is not always straightforward to
534 determine function (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Here, *M. anisopliae* putative GH20
535 NAGase genes revealed induced transcript production in the presence of chitin, potentially
536 in the extracellular milieu. The detection of *MaNAG3* and *MaNAG4* putative genes is the
537 first evidence for the presence of a possible GH3 family of NAGases in entomopathogenic
538 fungi. *MaNAG3* and *MaNAG4* expression is responsive to chitinous substrates, suggesting
539 their potential influence on cell differentiation during the *M. anisopliae* life cycle.

540

541 **5. Acknowledgments**

542 This study was supported by grants and fellowships from CNPq, CAPES and FAPERGS.

543

544 **6. Competing Interests**

545 The authors declare that they have no competing interests.

546

547 **7. References**

- 548 Adamek L (1965) Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.).
549 *Folia Microbiol (Praha)* 10:255–257.
- 550 Alcazar-Fuoli L, Clavaud C, Lamarre C, Aimanianda V, Seidl-Seiboth V, Mellado E and
551 Latgé JP (2011) Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in
552 *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 48:418–429.
- 553 Andersen CL, Jensen JL and Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative
554 reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to
555 identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.
556 *Cancer Res* 64:5245–5250.
- 557 Anisimova M and Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a Fast,
558 accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55:539–552.
- 559 Anisimova M, Gil M, Dufayard J-F, Dessimoz C and Gascuel O (2011) Survey of branch
560 support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-
561 based approximation schemes. *Syst Biol* 60:685–699.
- 562 Balcewich MD, Stubbs KA, He Y, James TW, Davies GJ, Vocadlo DJ and Mark BL
563 (2009) Insight into a strategy for attenuating AmpC-mediated beta-lactam resistance:
564 structural basis for selective inhibition of the glycoside hydrolase NagZ. *Protein Sci*
565 18:1541–51.
- 566 Barreto CC, Staats CC, Schrank A and Vainstein MH (2004) Distribution of chitinases in
567 the entomopathogen *metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in
568 protein secretion. *Curr Microbiol* 48:102–107.
- 569 Beier S and Bertilsson S (2013) Bacterial chitin degradation – mechanisms and
570 ecophysiological strategies. *Front Microbiol* 4:149.
- 571 Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G and Brunak S (2004) Feature-based
572 prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel*
573 17:349–56.
- 574 Bischoff JF, Rehner S a and Humber R a (2009) A multilocus phylogeny of the
575 *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101:512–530.
- 576 Bjellqvist B, Basse B, Olsen E and Celis JE (1994) Reference points for comparisons of

- 577 two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH
578 scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*
579 15:529–39.
- 580 Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S and
581 Hochstrasser D (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH
582 gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023–
583 31.
- 584 Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH and Schrank A (2009)
585 Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its
586 virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr Genet* 55:551–60.
- 587 Brunner K, Peterbauer CK, Mach RL, Lorito M, Zeilinger S and Kubicek CP (2003) The
588 Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase
589 induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43:289–295.
- 590 Brzezinska MS, Jankiewicz U, Burkowska A and Walczak M (2014) Chitinolytic
591 microorganisms and their possible application in environmental protection. *Curr*
592 *Microbiol* 68:71–81.
- 593 Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V and Henrissat B (2009)
594 The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for
595 glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233–8.
- 596 Chauhan JS, Rao A and Raghava GPS (2013) In silico platform for prediction of N-, O-
597 and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS One* 8:e67008.
- 598 Chavan SB and Deshpande M V. (2013) Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product
599 of commercial potential. *Biotechnol Prog* 29:833–846.
- 600 Cheng Q, Li H, Merdek K and Park JT (2000) Molecular characterization of the beta-N-
601 acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J*
602 *Bacteriol* 182:4836–40.
- 603 Chitlaru E and Roseman S (1996) Molecular cloning and characterization of a novel beta-
604 N-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem* 271:33433–9.
- 605 Choi KH, Seo JY, Park KM, Park CS and Cha J (2009) Characterization of glycosyl
606 hydrolase family 3 β -N-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritima* and
607 *Thermotoga neapolitana*. *J Biosci Bioeng* 108:455–459.
- 608 Colabardini AC, Valkonen M, Huuskonen A, Siika-aho M, Koivula A, Goldman GH and
609 Saloheimo M (2016) Expression of two novel β -glucosidases from *Chaetomium*
610 *atrobrunneum* in *Trichoderma reesei* and characterization of the heterologous protein
611 products. *Mol Biotechnol* 58:821–831.
- 612 Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC, Grimwood J,
613 Schmutz J, Taga M, White GJ, Zhou S et al. (2009) The genome of *Nectria*
614 *haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS*
615 *Genet* 5:e1000618.
- 616 Cuomo CA, Guldener U, Xu J-R, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma L-J,
617 Baker SE, Rep M et al. (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link
618 between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317:1400–2.

- 619 da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein MH
620 and Schrank A (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from
621 *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol*
622 156:382–392.
- 623 Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D (2011) Europe PMC Funders Group
624 ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*
625 27:1164–1165.
- 626 Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni
627 R, Xu J-R, Pan H et al. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus
628 *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980–6.
- 629 Díez B, Rodríguez-Sáiz M, De La Fuente JL, Moreno MÁ and Barredo JL (2005) The
630 nagA gene of *Penicillium chrysogenum* encoding β -N- acetylglucosaminidase. *FEMS*
631 *Microbiol Lett* 242:257–264.
- 632 Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161:345–60.
- 633 Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M and Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor
634 for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its
635 application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*,
636 *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J*
637 *Mol Biol* 337:243–53.
- 638 Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma L-
639 J, Smirnov S, Purcell S et al. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus
640 *Neurospora crassa*. *Nature* 422:859–68.
- 641 Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, Lee S-I, Baştürkmen
642 M, Spevak CC, Clutterbuck J et al. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and
643 comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105–15.
- 644 Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G et al.
645 (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model
646 entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*
647 7:e1001264.
- 648 Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W and Gascuel O (2010) New
649 algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the
650 performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321.
- 651 Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, Zhu Y, Feng Y, Wang G, Peng C, Jiang X et al.
652 (2014) Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium*
653 *oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS One* 9:e95543.
- 654 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
655 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- 656 Hartl L, Zach S and Seidl-Seiboth V (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic
657 properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:533–543.
- 658 Hu X, Xiao G, Zheng P, Shang Y, Su Y, Zhang X, Liu X, Zhan S, St Leger RJ and Wang
659 C (2014) Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host
660 adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:16796–801.

- 661 Intra J, Pavesi G and Horner DS (2008) Phylogenetic analyses suggest multiple changes of
662 substrate specificity within the glycosyl hydrolase 20 family. *BMC Evol Biol* 8:1–17.
- 663 Junges Â, Boldo JT, Souza BK, Guedes RLM, Sbaraini N, Kmetzsch L, Thompson CE,
664 Staats CC, de Almeida LGP, de Vasconcelos ATR et al. (2014) Genomic analyses and
665 transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the
666 entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *PLoS One* 9:e107864.
- 667 Kappel L, Gaderer R, Flipphi M and Seidl-Seiboth V (2016) The N-acetylglucosamine
668 catabolic gene cluster in *Trichoderma reesei* is controlled by the Ndt80-like
669 transcription factor RON1. *Mol Microbiol* 99:640–657.
- 670 Kawaguchi T, Enoki T, Tsurumakia S, Ooib T and Arai M (1996) Cloning and sequencing
671 of the cDNA encoding β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. 173:287–288.
- 672 Kim S, Matsuo I, Ajisaka K, Nakajima H and Kitamoto K (2002) Cloning and
673 characterization of the nagA gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from
674 *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol*
675 *Biochem* 66:2168–2175.
- 676 Koga K, Iwamoto Y, Sakamoto H, Hatano K, Sano M and Kato I (1991) Purification and
677 characterization of β -N-Acetylhexosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Agric*
678 *Biol Chem* 55:2817–2823.
- 679 Krogh A, Larsson B, von Heijne G and Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane
680 protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J*
681 *Mol Biol* 305:567–80.
- 682 Krogh KBRM, Harris P V, Olsen CL, Johansen KS, Hojer-pedersen J, Borjesson J and
683 Olsson L (2010) Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -
684 glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:143–154.
- 685 Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M,
686 Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK et al. (2011) Comparative
687 genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of
688 *Trichoderma*. *Genome Biol* 12:R40.
- 689 Kudo K, Watanabe A, Ujiie S, Shintani T and Gomi K (2015) Purification and enzymatic
690 characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases
691 screened from *Aspergillus oryzae* genome. *J Biosci Bioeng* 120:614–623.
- 692 Langner T and Göhre V (2015) Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles
693 in plant/pathogen interactions. *Curr Genet* 62:243–254.
- 694 Li H, Morimoto K, Katagiri N, Kimura T, Sakka K, Lun S and Ohmiya K (2003) A novel
695 β -N-acetylglucosaminidase of *Clostridium paraputrificum* M-21 with high activity on
696 chitobiose. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:420–427.
- 697 Liu H, Haga K, Yasumoto K, Ohashi Y, Yoshikawa H and Takahashi H (1997) Sequence
698 and analysis of a 31 kb segment of the *Bacillus subtilis* chromosome in the area of the
699 *rrnH* and *rrnG* operons. *Microbiology* 143:2763–7.
- 700 Liu T, Yan J and Yang Q (2012) Comparative biochemistry of GH3, GH20 and GH84 β -
701 N-acetyl-D-hexosaminidases and recent progress in selective inhibitor discovery. *Curr*
702 *Drug Targets* 13:512–525.

- 703 Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-
704 time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- 705 López-Mondéjar R, Catalano V, Kubicek CP and Seidl V (2009) The β -N-
706 acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma*
707 *atroviride* on chitin. *FEBS J* 276:5137–5148.
- 708 Löytynoja A and Goldman N (2010) webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence
709 aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics* 11:579.
- 710 Macdonald SS, Blaukopf M and Withers SG (2015) N-acetylglucosaminidases from CAZy
711 family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of
712 histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. *J Biol Chem* 290:4887–
713 4895.
- 714 Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH,
715 Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M et al. (2009) CDD: specific functional
716 annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37:D205–10.
- 717 Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J,
718 Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D et al. (2008) Genome sequencing and analysis of
719 the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat*
720 *Biotechnol* 26:553–60.
- 721 Mayer C, Vocadlo DJ, Mah M, Rupitz K, Stoll D, Warren R a J and Withers SG (2006)
722 Characterization of a beta-N-acetylhexosaminidase and a beta-N-
723 acetylglucosaminidase/beta-glucosidase from *Cellulomonas fimi*. *FEBS J* 273:2929–
724 2941.
- 725 Nakajima M, Yamashita T, Takahashi M, Nakano Y and Takeda T (2012) Identification,
726 cloning, and characterization of β -glucosidase from *Ustilago esculenta*. *Appl*
727 *Microbiol Biotechnol* 93:1989–1998.
- 728 Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe
729 K, Archer DB, Bermejo C et al. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and
730 allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151–6.
- 731 Novodvorska M, Stratford M, Blythe MJ, Wilson R, Beniston RG and Archera DB (2016)
732 Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes
733 during conidial outgrowth. *Fungal Genet Biol* 94:23–31.
- 734 Patil RS, Ghormade V and Deshpande M V. (2000) Chitinolytic enzymes: An exploration.
735 *Enzyme Microb Technol* 26:473–483.
- 736 Pei X, Zhao J, Cai P, Sun W, Ren J, Wu Q, Zhang S and Tian C (2016) Heterologous
737 expression of a GH3 β -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with
738 high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides.
739 *Protein Expr Purif* 119:75–84.
- 740 Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries
741 RP, Albang R, Albermann K et al. (2007) Genome sequencing and analysis of the
742 versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25:221–31.
- 743 Peterbauer CK, Lorito M, Hayes CK, Harman GE and Kubicek CP (1996) Molecular
744 cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding

- 745 gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr Genet* 30:325–331.
- 746 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G and Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating
747 signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–6.
- 748 Pinto ADS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ and Vainstein MH (1997) Purification and
749 characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium*
750 *anisopliae*. *Can J Microbiol* 43:322–327.
- 751 Rast DM, Horsch M, Furter R and Gooday GW (1991) A complex chitinolytic system in
752 exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *J Gen*
753 *Microbiol* 137:2797–810.
- 754 Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L,
755 Suchard MA and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian
756 phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*
757 61:539–542.
- 758 Ryšlavá H, Kalendová A, Doubnerová V, Skočdopol P, Kumar V, Kukačka Z, Pompach P,
759 Vaněk O, Slámová K, Bojarová P et al. (2011) Enzymatic characterization and
760 molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β -N-acetylhexosaminidase.
761 *FEBS J* 278:2469–2484.
- 762 Santi L, Beys da Silva WO, Berger M, Guimarães JA, Schrank A and Vainstein MH
763 (2010) Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities
764 related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 55:874–880.
- 765 Santi L, Silva WOB da, Pinto AFM, Schrank A and Vainstein MH (2009) Differential
766 immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related
767 to *Rhipicephalus microplus* infection. *Res Microbiol* 160:824–828.
- 768 Schrank A and Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*
769 56:1267–74.
- 770 Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with
771 multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22:36–42. d
- 772 Seidl V, Druzhinina IS and Kubicek CP (2006) A screening system for carbon sources
773 enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis*
774 (*Trichoderma atroviride*). *Microbiology* 152:2003–2012.
- 775 Seidl V, Huemer B, Seiboth B and Kubicek CP (2005) A complete survey of *Trichoderma*
776 *chitinases* reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* 272:5923–
777 5939.
- 778 Sela I, Ashkenazy H, Katoh K and Pupko T (2015) GUIDANCE2: accurate detection of
779 unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters.
780 *Nucleic Acids Res* 43:W7–14.
- 781 Slámová K, Bojarová P, Petrásková L and Křen V (2010) B-N-Acetylhexosaminidase:
782 What's in a name...? *Biotechnol Adv* 28:682–693.
- 783 Slámová K, Kulik N, Fiala M, Krejzová-Hofmeisterová J, Etrich R and Křen V (2014)
784 Expression, characterization and homology modeling of a novel eukaryotic GH84 β -
785 N-acetylglucosaminidase from *Penicillium chrysogenum*. *Protein Expr Purif* 95:204–
786 210.

- 787 St. Leger RJ, Cooper RM and Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and
788 chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J
789 Invertebr Pathol 58:415–426.
- 790 Staats CC, Junges A, Guedes RLM, Thompson CE, de Morais GL, Boldo JT, de Almeida
791 LGP, Andreis FC, Gerber AL, Sbaraini N et al. (2014) Comparative genome analysis
792 of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. BMC Genomics
793 15:822.
- 794 Staats CC, Kmetzsch L, Lubeck I, Junges A, Vainstein MH and Schrank A (2013)
795 *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and
796 contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. Fungal Biol 117:137–44.
- 797 Stubbs KA, Balcewich M, Mark BL and Vocadlo DJ (2007) Small molecule inhibitors of a
798 glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC-mediated beta-lactam resistance. J Biol
799 Chem 282:21382–91.
- 800 Tharanathan RN and Kittur FS (2003) Critical reviews in food science and nutrition chitin:
801 the undisputed biomolecule of great potential chitin. Crit Rev Food Sci Nutr 43:61–87.
- 802 Thorat L, Oulkar D, Banerjee K, Gaikwad SM and Nath BB (2017) High-throughput mass
803 spectrometry analysis revealed a role for glucosamine in potentiating recovery
804 following desiccation stress in *Chironomus*. Sci Rep 7:3659.
- 805 Tsujibo H, Fujimoto K, Tanno H, Miyamoto K, Imada C, Okami Y and Inamori Y (1994)
806 Gene sequence, purification and characterization of N-acetyl-beta-glucosaminidase
807 from a marine bacterium, *Alteromonas sp.* strain O-7. Gene 146:111–5.
- 808 Tsujibo H, Hatano N and Mikami T (1998) A Novel β -N-Acetylglucosaminidase from
809 *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 : gene cloning, expression, and assignment to
810 family 3 of the glycosyl hydrolases. Appl Environ Microbiol 64:2920–2924.
- 811 Tzelepis GD, Melin P, Jensen DF, Stenlid J and Karlsson M (2012) Functional analysis of
812 glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol
813 49:717–30.
- 814 Vandesompele J, Preter K De, Pattyn F, Poppe B, Roy N Van, Paepe A De and Speleman
815 F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric
816 averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3:research0034.
- 817 Wang H, Xu Z, Gao L and Hao B (2009) A fungal phylogeny based on 82 complete
818 genomes using the composition vector method. BMC Evol Biol 9:1–13.
- 819 Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D,
820 Bencina M, Braus G, Coutinho P et al. (2009) The 2008 update of the *Aspergillus*
821 *nidulans* genome annotation: a community effort. Fungal Genet Biol 46 Suppl 1:S2–
822 13.
- 823 Xia Y, Clarkson J. and Charnley A. (2002) Trehalose-hydrolysing enzymes of
824 *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm,
825 *Manduca sexta*. J Invertebr Pathol 80:139–147.
- 826 Xiao G, Ying S-H, Zheng P, Wang Z-L, Zhang S, Xie X-Q, Shang Y, St. Leger RJ, Zhao
827 G-P, Wang C et al. (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal
828 entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Sci Rep.

- 829 Yang S, Song S, Yan Q, Fu X, Jiang Z and Yang X (2014) Biochemical characterization of
830 the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from
831 *Rhizomucor miehei*. J Agric Food Chem 62:5181–90.
- 832 Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F and Xu Y (2012) dbCAN: a web resource for
833 automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res 40:W445–51.
- 834 Zdobnov EM and Apweiler R (2001) InterProScan - an integration platform for the
835 signature-recognition methods in InterPro. Bioinformatics 17:847–8.
- 836 Zhao J, Guo C, Tian C and Ma Y (2015) Heterologous expression and characterization of a
837 GH3 β -glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia*
838 *pastoris*. Appl Biochem Biotechnol 177:511–527.
- 839 Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu X, Zhang S, Zheng H, Huang Y, Zhou Y, Wang S et
840 al. (2011) Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a
841 valued traditional chinese medicine. Genome Biol 12:R116.

Figures and Tables

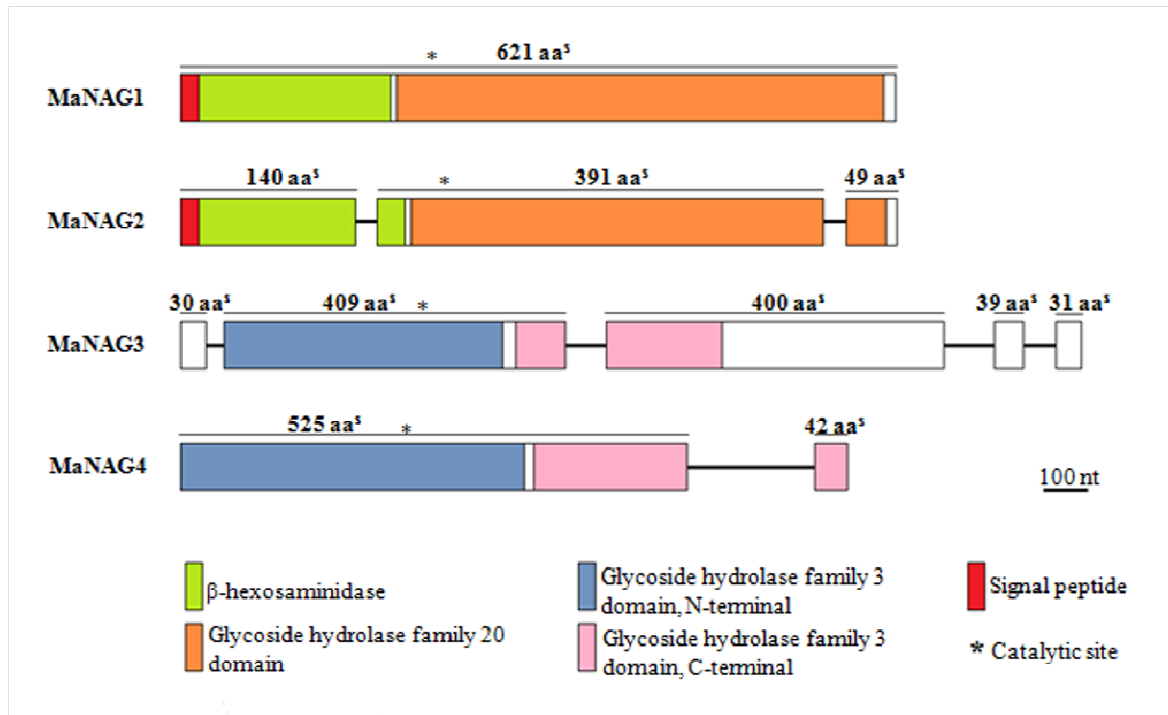


Figure 1. Modular domain structure from *M. anisopliae* NAGase genes. NAGase genes exhibit specific conserved domains with different compositions. Coding exonic sequences are depicted as boxes (color codes are indicated) and introns as thin lines. Domains were identified using Conserved Database Domain (at NCBI), dbCAN and InterProScan. Signal peptide sequences were predicted using SignalP 4.1. Blank protein regions indicate the absence of characterized domains.

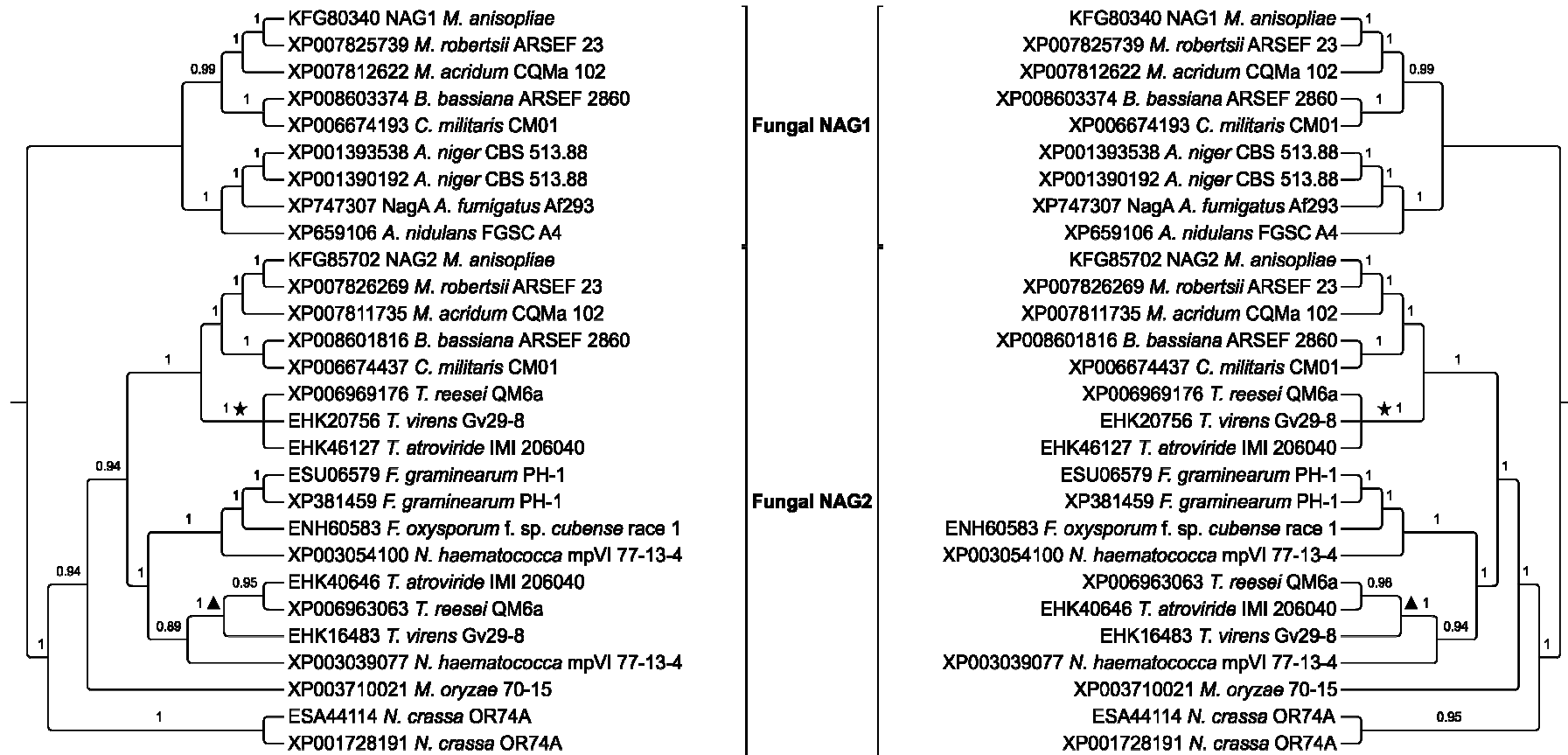


Figure 2. Phylogenetic relationships among GH20 NAGases from filamentous fungi. The phylogenies were obtained using MrBayes 3.2.5 (left side) and PhyML 3.1 (right side). ▲: *Trichoderma* NAG1. ★: *Trichoderma* NAG2.

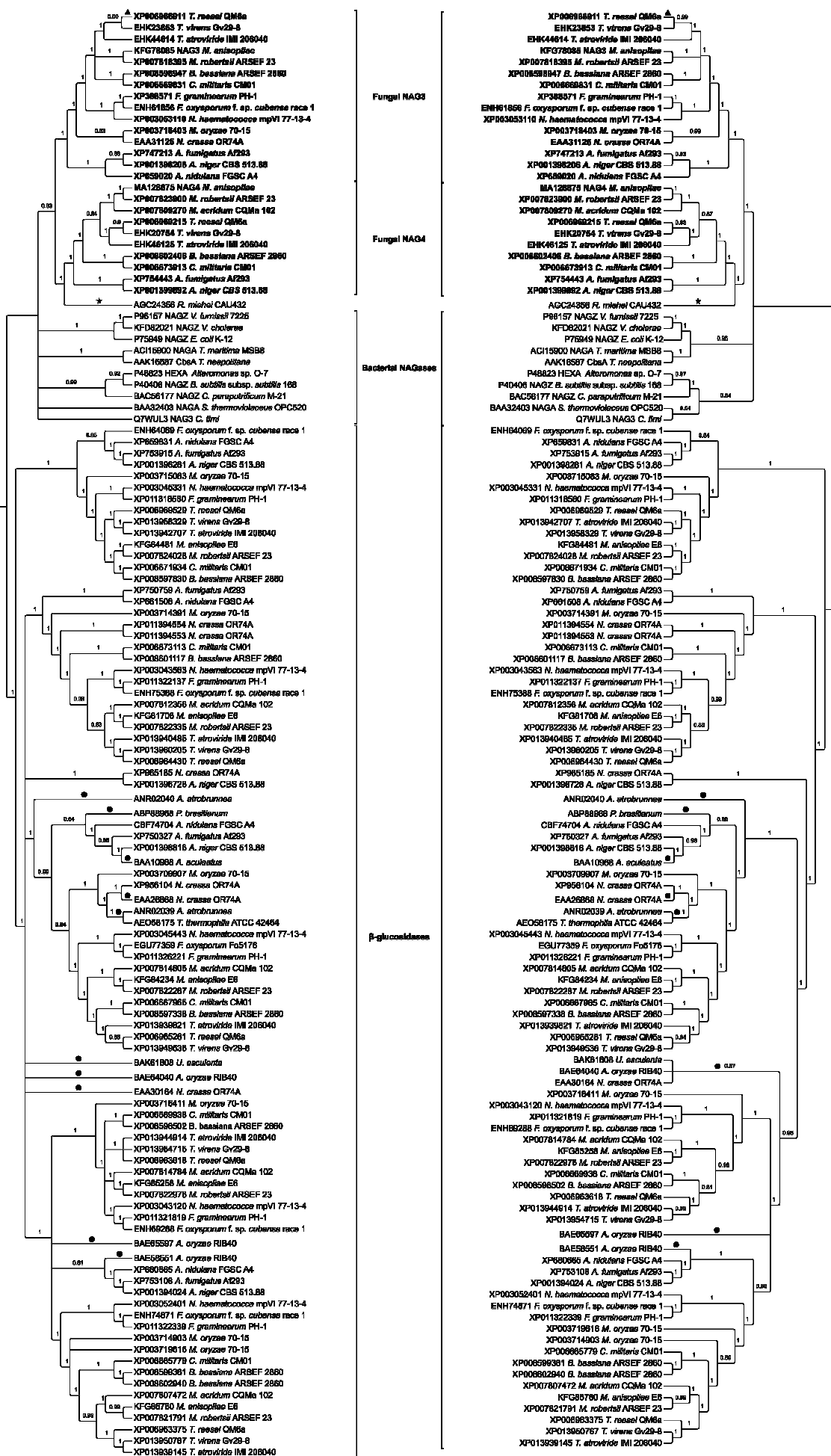


Figure 3. Phylogenetic relationships among GH3 NAGases from filamentous fungi, bacteria and zygomycetes. Putative and characterized fungal GH3 β -glucosidases were included as an outgroup. The phylogenies were obtained using MrBayes 3.2.5 (left side) and PhyML 3.1 (right side). ★: NAGase from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. ●: Nodes with support values below 0.8 were collapsed into polytomies.

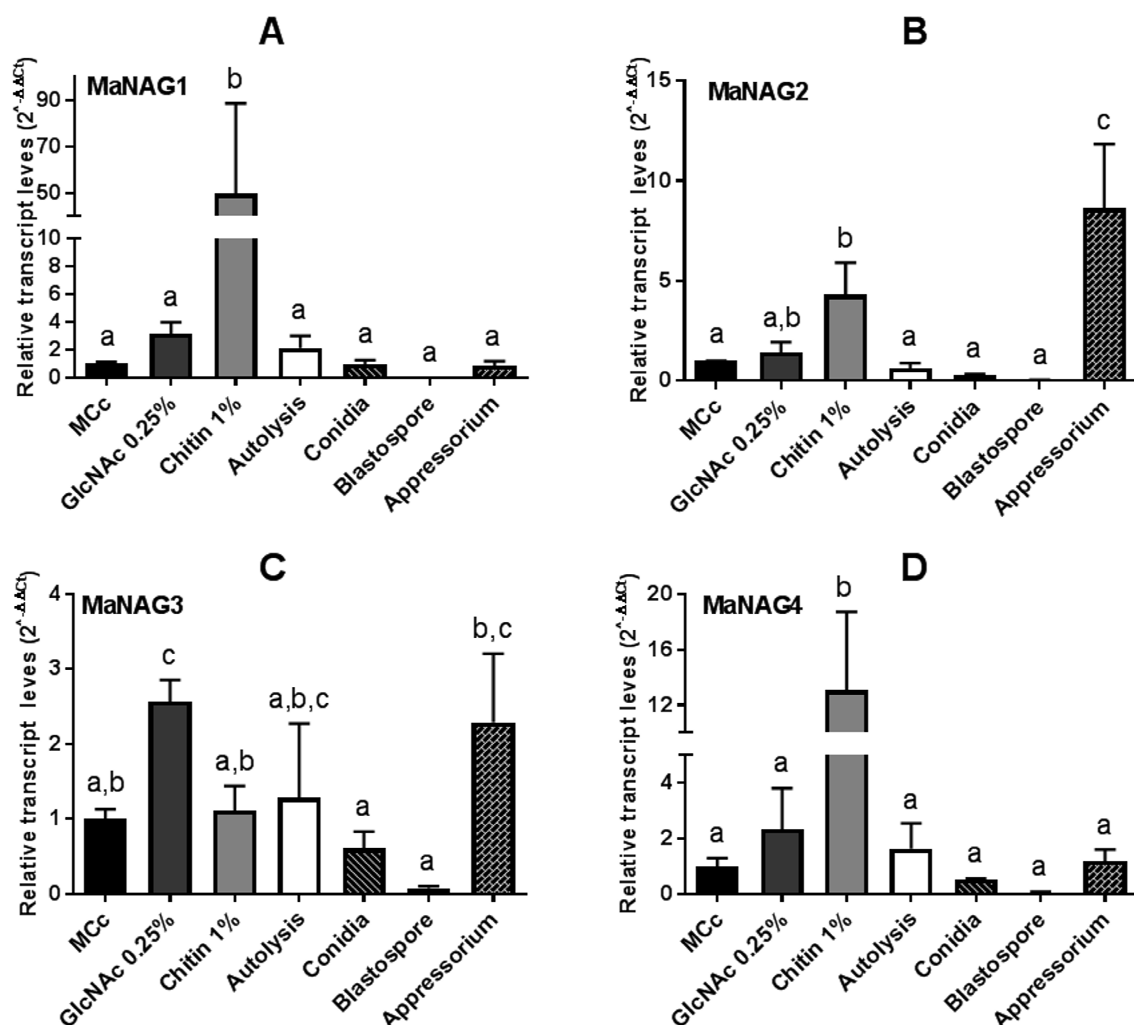


Figure 4. Relative expression of GH20 and GH3 NAGase genes in *M. anisopliae*, considering Mcc as the reference condition. Transcriptional profiles of GH20 NAGase genes (MaNAG1 and MaNAG2) and GH3 NAGase genes (MaNAG3 and MaNAG4) in seven different conditions (mycelium growth on different carbon source media, autolysis, and different cell types), using *tefla* as a reference gene and applying the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. A: *nag1*; B: *nag2*; C: *nag3*; D: *nag4*. Standard error bars are indicated. Different letters (a/b/c) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) among studied conditions.

Table 1. List of microorganisms used in GH20 and GH3 NAGases phylogenetic analysis.

Category ^a	Microorganisms	Protein name ^b	Reference
Fungi			
A, B, C	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293		(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
A, B, C	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4		(Galagan <i>et al.</i> , 2005; Wortman <i>et al.</i> , 2009)
A, B, C	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88		(Pel <i>et al.</i> , 2007)
A, B, C	<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 2860		(Xiao <i>et al.</i> , 2012)
A, B, C	<i>Cordyceps militaris</i> CM01		(Zheng <i>et al.</i> , 2011)
A, B, C	<i>Fusarium graminearum</i> PH-1		(Cuomo <i>et al.</i> , 2007)
A, B, C	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		(Guo <i>et al.</i> , 2014)
A, B, C	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15		(Dean <i>et al.</i> , 2005)
A, B, C	<i>Metarhizium acridum</i> CQMα 102		(Gao <i>et al.</i> , 2011)
A, B, C	<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 23		(Gao <i>et al.</i> , 2011; Hu <i>et al.</i> , 2014)
A, B, C	<i>Nectria haematococca</i> MPVI 77-13-4		(Coleman <i>et al.</i> , 2009)
A, B	<i>Neurospora crassa</i> OR74A		(Galagan <i>et al.</i> , 2003)
A, B, C	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040		(Kubicek <i>et al.</i> , 2011)
A, B, C	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a		(Martinez <i>et al.</i> , 2008)
A, B, C	<i>Trichoderma virens</i> Gv29-8		(Kubicek <i>et al.</i> , 2011)
B	<i>Rhizomucor miehei</i>	RmNag	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
C	<i>Amesia atrobrunnea</i>	CEL3a, CEL3b	(Colabardini <i>et al.</i> , 2016)
C	<i>Aspergillus aculeatus</i>	BGL1	(Kawaguchi <i>et al.</i> , 1996)
C	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	BglA, BglF, BglJ	(Kudo <i>et al.</i> , 2015)
C	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	BGL2	(Pei <i>et al.</i> , 2016)
C	<i>Penicillium brasilianum</i>	BGL1	(Krogh <i>et al.</i> , 2010)
C	<i>Thermothelomyces thermophila</i> ATCC 42464	MtBgl3b	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
C	<i>Ustilago esculenta</i>	UeBgl3A	(Nakajima <i>et al.</i> , 2012)
Bacteria			
B	<i>Alteromonas</i> sp. 0-7	HEXA	(Tsujiibo <i>et al.</i> , 1994)
B	<i>Bacillus subtilis</i> 168	NAGZ	(Liu <i>et al.</i> , 1997)
B	<i>Cellulomonas fimi</i>	NAG3	(Mayer <i>et al.</i> , 2006)
B	<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	NAGZ	(Li <i>et al.</i> , 2003)
B	<i>Escherichia coli</i> K-12	NAGZ	(Cheng <i>et al.</i> , 2000)
B	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	NAGA	(Tsujiibo <i>et al.</i> , 1998)
B	<i>Thermotoga maritima</i> NSB-8	NAGA	(Choi <i>et al.</i> , 2009)
B	<i>Thermotoga neapolitana</i> KCCM-41025	CBSA	(Choi <i>et al.</i> , 2009)
B	<i>Vibrio cholerae</i>	NAGZ	(Stubbs <i>et al.</i> , 2007;

			Balcewich <i>et al.</i> , 2009)
B	<i>Vibrio furnissii</i> 7225	NAGZ	(Chitlaru and Roseman, 1996)

^aMicroorganisms were classified according to their use in phylogenetic analysis: (A) microorganisms containing *M. anisopliae* GH20 NAGases orthologs; (B) microorganisms containing *M. anisopliae* GH3 NAGases orthologs; and (C) microorganisms containing β -glucosidases included as an outgroup in GH3 NAGase phylogenetic analysis.

^bNamed proteins are characterized enzymes.

Table 2. Properties of *Metarhizium anisopliae* GH20 and GH3 β -N-acetylglucosaminidases.

Identification	GH family	ORF length (nt)	Introns	Protein length (aa)	Mature protein theoretical kDa	Theoretical pI	Conserved domain	Transmembrane domain	Signal peptide	GPI or NCS	N-glycosylation site	Accession number
MaNAG1	GH20	1,863	0	620	66.98	6.07	cl02948 / pfam14845	-	+	-	4	KFG80340
MaNAG2	GH20	1,862	2	579	61.42	4.85	cd06562 / pfam14845	-	+	-	4	KFG85702
MaNAG3	GH3	2,730	4	909	98.71	6.25	COG1472	+	-	-	6	KFG78085
MaNAG4	GH3	1,701	1	566	60.67	5.6	COG1472	-	-	-	2	MANI_128875

(+): presence; (-) absence; pI: isoelectric point; GPI: GPI-anchor sites; NCS: non-classical secretion pathway regions.

Supplementary Material – the following online material is available for this article:

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

KFG85702 NAG2 *M. anisopliae* E6
 XP_007826269 *M. robertsii* ARSEF 23
 XP_007811735 *M. acridum* CQMa 102
 XP_008601816 *B. bassiana* ARSEF 2860
 XP_006674437 *C. militaris* CM01
 EHK46127 *T. atroviride* IMI 206040
 XP_006969176 *T. reesei* QM6a
 EHK20756 *T. virens* Gv29-8
 ESU06579 *F. graminearum* PH-1
 XP_381459 *F. graminearum* PH-1
 ENH60583 *F. oxysporum f.sp.cubense* race1
 XP_003054100 *N. haematococca* mpVI77-13-4
 XP_003039077 *N. haematococca* mpVI77-13-4
 EHK40646 *T. atroviride* IMI 206040
 XP_006963063 *T. reesei* QM6a
 EHK16483 *T. virens* Gv29-8
 XP_003710021 *M. oryzae* 70-15
 ESA44114 *N. crassa* OR74A
 XP_001728191 *N. crassa* OR74A
 KFG80340 NAG1 *M. anisopliae* E6
 XP_007825739 *M. robertsii* ARSEF 23
 XP_007812622 *M. acridum* CQMa 102
 XP_008603374 *B. bassiana* ARSEF 2860
 XP_006674193 *C. militaris* CM01
 XP_747307 NagA *A.fumigatus* Af293
 XP_001393538 *A. niger* CBS 513.88
 XP_001390192 *A. niger* CBS 513.88
 XP_659106 *A. nidulans* FGSC A4

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

KFG85702 NAG2 *M. anisopliae* E6
 XP_007826269 *M. robertsii* ARSEF 23
 XP_007811735 *M. acridum* CQMa 102
 XP_008601816 *B. bassiana* ARSEF 2860
 XP_006674437 *C. militaris* CM01
 EHK46127 *T. atroviride* IMI 206040
 XP_006969176 *T. reesei* QM6a
 EHK20756 *T. virens* Gv29-8

GH20 conserved sequence motif

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
KFG85702 NAG2 <i>M. anisopliae</i> E6	NFISTLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAT	D	MTLLQPLLORFLDHAHNNI	I	VWEEMVE	E	WDVGNQIVVQAWL	G	SASVAKL	
XP_007826269 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	NFVSTLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAT	D	MTLLQPLLORFLDHAHNNI	I	VWEEMVE	E	WDVGNQIVVQAWL	G	SASVAKL	
XP_007811735 <i>M. acridum</i> CQMa 102	DFISTLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAA	D	MTVLKPLLORFLDHAHNSI	I	VWEEMVE	E	WDVGNQIVVQSWL	G	STSVTKL	
XP_008601816 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	EFLLKLFEDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAN	N	VSILQPLLORFLDHAHKKI	M	VWEEMIN	E	WTLGKDVVQSWL	A	QDSIKKL	
XP_006674437 <i>C. militaris</i> CM01	EFLLKLFEDLLPRVSPYAYFHTGGDEYKVN	N	SVLQPLLORFLDHAHNV	M	VWEEMVS	E	WTIGKDVVQSWL	G	AKSVKKL	
EHK46127 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	KFIDLLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAN	S	QSVLQPLLQKFLDVAHKKV	M	VWEEMIL	D	WTLGKDVVAQTWL	G	GAIQKL	
XP_006969176 <i>T. reesei</i> QM6a	KFIDLLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAN	N	VKIQPMLORFLDTHKKV	M	VWEEMIL	D	WTLGKDVVAQTWL	G	GAIQKL	
EHK20756 <i>T. virens</i> Gv29-8	KFIDLLFDLLPRLSPYAYFHTGGDEYKAN	N	MSVLQPMLORFLDVAHKKV	M	VWEEMIL	D	WTLGKDVVAQTWL	G	GAIQKL	
ESU06579 <i>F. graminearum</i> PH-1	DFLDLFDLLFPRIKVPYFHLGGDELNHN	N	KTEVLAPELLQKFDVDTGCKV	F	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	GAIKTL	
XP_381459 <i>F. graminearum</i> PH-1	DFLDLFDLLFPRIKVPYFHLGGDELNHN	N	KTEVLAPELLQKFDVDTGCKV	F	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	GAIKTL	
ENH60583 <i>F. oxysporum f.sp.cubense</i> racel1	DFLDLFDLLFPRIKVPYFHLGGDELNHN	N	KTEVLAPELLQKFDVDTGCKV	F	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	GAIKTL	
XP_003054100 <i>N. haematococca</i> mpVI77-13-4	DFLDLFDLLFPRIKVPYFHLGGDELNHN	N	KTEVLAPELLQKFDVDTGCKV	F	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	GAIKTL	
XP_003039077 <i>N. haematococca</i> mpVI77-13-4S	DFLDLFDLLFPRIKVPYFHLGGDELNHN	N	KTEVLAPELLQKFDVDTGCKV	F	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	GAIKTL	
EHK40646 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	DFVDKLFDLLPRVTPYAYFHTGGDELNAN	N	SSDVLQPLLQKFLFAHSKI	L	VWEEMVT	T	WTLGSDIVVQSWL	G	DAVKNL	
XP_006963063 <i>T. reesei</i> QM6a	DFVDLFDLLPRVAPYAYFHTGGDELNAN	N	NATDVLQPLLQKFLFAHAKI	F	VWEEMVT	T	WTLGSDIVVQSWL	G	DAVKNL	
EHK16483 <i>T. virens</i> Gv29-8	SFLDLFDLLPRLSPYAYFHTGGDELNAN	N	DTAVLQPLLQKFLFAHAKI	F	VWEEMVT	T	WTLGSDIVVQSWL	G	DAVKNL	
XP_003710021 <i>M. oryzae</i> 70-15	AFLKLFDDVLPRLVHPYAYFHTGGDELNAN	N	NKSEVLQPLLQKFLDQHEKV	M	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	NAOKL	
ESA44114 <i>N. crassa</i> OR74A	DFLGLKLDLLPRVAPYAYFHTGGDELNAN	N	NDTEVLRLLQKFLDQHEKV	L	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	NAOKL	
XP_001728191 <i>N. crassa</i> OR74A	DFLGLKLDLLPRVAPYAYFHTGGDELNAN	N	NDTEVLRLLQKFLDQHEKV	L	VWEEMIT	E	WTLGKDVVQSWL	G	NAOKL	
KFG80340 NAG1 <i>M. anisopliae</i> E6	QVVGNYVSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADPKRTYFD	L	NQYWIIDHAYPLFGKKDIMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQVANIDKL							
XP_007825739 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	QVVGNYVSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADPKRTYFD	L	NQYWIIDHAYPLFGKKDIMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQVANIDKL							
XP_007812622 <i>M. acridum</i> CQMa 102	EVVGVVSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADPKRTYFD	L	NQYWIIDHAYPLFGKKDIMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQVANIDKL							
XP_008603374 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	QAVEKVVYSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADSSRTYFD	L	NQHWVMTAMPVFGNKDMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQITNIDKL							
XP_006674193 <i>C. militaris</i> CM01	AAVEKVVYSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADSSRTYFD	L	NQHWVMTAMPVFGNKDMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQITNIDKL							
XP_747307 NagA <i>A.fumigatus</i> Af293	DIVRVVYSELSSKFFS--DNWFHVVADEIQMWFQEDPSRTYND	L	SAQYVVDHVAVPIF--VMWEDIVLSTEHQVPTDIVMOTWNNGLDYINQL							
XP_001393538 <i>A. niger</i> CBS 513.88	DIVRVVYSELSSKFFS--DNWFHVVADEIQMWFQEDPSRTYND	L	SAQYVVDHVAVPIF--VMWEDIVLSTEHQVPTDIVMOTWNNGLDYINQL							
XP_001390192 <i>A. niger</i> CBS 513.88	---YSELSSKFFS--DNWFHVVADEIQMWFQEDPSRTYND	L	SAQYVVDHVAVPIF--VMWEDIVLSTEHQVPTDIVMOTWNNGLDYINQL							
XP_659106 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	EVVQVYSELSSKFFS--DDFPHVGGDELOIGWFAADPKRTYFD	L	NQHWVMTAMPVFGNKDMWEDVVLSPDAHVSKSVIMOSWNNQVANIDKL							
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
KFG85702 NAG2 <i>M. anisopliae</i> E6	AAAGHKVIDSTFDIYVLDCCRGQWLDDAA	F	A	DYCSPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	M	DPVSLDTLAWPRAAA		
XP_007826269 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	ATAGHKVIDSTFDIYVLDCCRGQWLDDAA	F	A	DYCSPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	M	DPVSLDTLAWPRAAA		
XP_007811735 <i>M. acridum</i> CQMa 102	ATAGHKVIDSSDFYVLDCCRGQWLDDAA	F	N	DWCAPTKNWRLIYAHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_008601816 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	AESEHKVVVSSDAYVLDCCRGQVLDQRA	F	T	DWCAPTKNWRLIYAQDPRAGLSEFAAKLVLGGEVAVWTE	T	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_006674437 <i>C. militaris</i> CM01	AEAGHKVIVSTADAYVLDCCRGQVLDQSA	F	T	DWCAPTKNWRLIYAQDPRAGLSEFAAKLVLGGEVAVWTE	T	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
EHK46127 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	AQLEKVIDSSNDFYVLDCCRGQVLDQNN	F	L	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_006969176 <i>T. reesei</i> QM6a	AEAGHKVIDSSNQFYVLDCCRGQVLDQNN	F	L	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
EHK20756 <i>T. virens</i> Gv29-8	AEAEKVIDSSNDFYVLDCCRGQVLDQNN	F	L	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
ESU06579 <i>F. graminearum</i> PH-1	AEAGHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_381459 <i>F. graminearum</i> PH-1	AEAGHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
ENH60583 <i>F. oxysporum f.sp.cubense</i> racel1	AEAGHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_003054100 <i>N. haematococca</i> mpVI77-13-4	AAAGHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_003039077 <i>N. haematococca</i> mpVI77-13-4A	AESEHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
EHK40646 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	AESEHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
XP_006963063 <i>T. reesei</i> QM6a	AESEHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		
EHK16483 <i>T. virens</i> Gv29-8	AESEHKVIDSDYVFWVLDCCRGQVLDQNTY	F	N	DWCAPTKNWRLIYSHDFVEMTAFAAAA	V	IGGEVAVWTE	T	IDPSSLDITVWPRAAA		

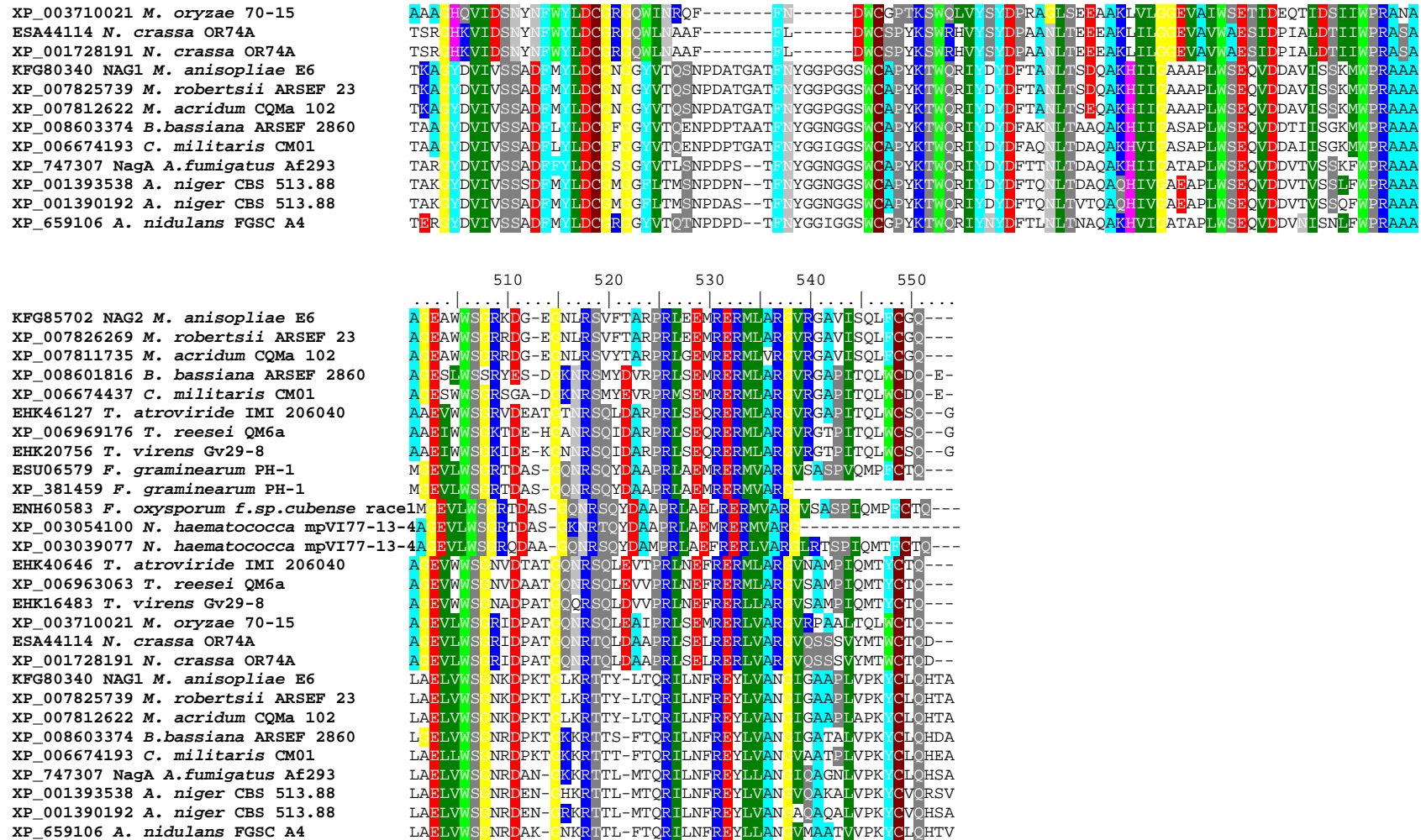


Figure S1. Multiple alignment of GH20 NAGases from filamentous fungi. Amino acid alignment built and trimmed with GUIDANCE2 using PRANK as the MSA algorithm with 100 bootstrap references. Location of the GH20 conserved sequence motif (H/N-x-G-A/C/G/M-D-E-A/I/L/V) is highlighted.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KFG84234 M. anisopliae E6 -----SPPHYPSPWEDAYKQARFVS-----LAEKVN-----TTT
KFG86760 M. anisopliae E6 -----SPPIYPSPWAAAYQKAKLVS-----LEEKVN-----VTG
KFG85258 M. anisopliae E6 -----SPPVYPTPWADAYVQARFVA-----LEEKVN-----ITR
KFG81708 M. anisopliae E6 -----PSYYPAPWQESYRKARFVA-----LAEKTN-----LTA
KFG84481 M. anisopliae E6 -----VLE-----LAEKVD-----LLT
ACI15900 NAGA T. maritima MSB8 -----GKLEFF-CGFN-----DFNEEVKELTRKVRPTGILLYPGVLSKEYLLMDFMSEFLSKEGD-----FLI
AAK16587 Cbsa T. neapolitana -----GKLEFF-CGFD-----DFNEEAREVITQRKPAGVLIYPGVLSKEYLFLDFMNFSLSRNGR-----FIV
BAA32403 NAGA S. thermoviolaceus OPC520 -----GOLFV-MRVYGI-----DANLEIEIELKQHVCGLIYFAHNTDPQQTADLSNGTOKAALAQPGRGLLELI
AGC24356 R. miehei CAU432 -----GOLLM-CGFDGL-----EPTPCIDLLEENLGSIIILFSRNTATPKOVQKLTHTSLQQLARNAGHKRPLFI
MA128875 NAG4 M. anisopliae E6 -----VOLFA-VGFYGT-----EINKEIKSLSIQDVGCAVLLFKRNKDAALQALCLGLQQLAODAGHTQPLFV
XP007823900 M. robertsii ARSEF 23 -----GOLFA-VGFYGT-----EINKEIKSLSIQDVGCAVLLFKRNKDAALQALCLGLQQLAKKAGHTQPLFV
XP007809270 M. acridum CQMa 102 -----GOLFA-VGFYGT-----EINKEIKSLSIQDVGCAIVLTKRNQDAAALQALCLGLQKLASDAGHAQPLLV
EHK46125 T. atroviride IMI 206040 -----GOLFA-VGFHGR-----EINKEITTLIRDVGCAIVLTKRNVLDAALQALCLGLQKLASDAGHAQPLFI
XP006969215 T. reesei QM6a -----VOLFA-VGFHGR-----EINQBITTLIRDVGCAIVLTKRN-----
EHK20754 T. virens Gv29-8 -----GOLFA-VGFHGR-----EINKEITTLIRDVGCAIVLTKRNVLDAALQALCLGLQKLAKKAGHSOPLFI
XP008602406 B. bassiana ARSEF 2860 -----GOLFA-VGFHDT-----FINSDIKSLSIQDVGCAIVLTKRNVSATOLRTLCHDLQQLAHNAGHAQPLLI
XP006673913 C. militaris CM01 -----GOLFA-VGFHDT-----TWNSATISLSIQDVGCAVLLFKRNVRSAAALRTLCHDLQQLARDAGHAQPLLI
XP754443 A. fumigatus Af293 -----GOLFA-VGFHGV-----VPSPEIKTLIHEGIGIIVLTKRNIQNAMLOQ-----
XP001399892 A. niger CBS 513.88 -----GOLFA-VGFHGL-----TPSPEIKTLIHDGIGIIVLTKRNVSAAALQALTHALOEERLARGHEHEPLLI
P48823 HEXA Alteromonas sp. strain O7 -----GOKLM-LDFRYT-----TTPPEISELISR-DIGAILFAENVONTAGIISLITNALQSAAQCKSKSQPLFI
P40406 NAGZ B. subtilis subtilis 168 -----GOLLM-PDFRNT-----KMNDEWASLVKKQFEGHILFAENVKTTKTVQLTDDYOKASPK-----IPLML
BAC56177 NAGZ C. paraputrificum M21 -----GOMMF-YGVNGT-----NVDDKVVNLEEDQHACGIIIVYGHNRNSLDNNVKYVNSTKKANRQON-SDIFLFI
P75949 NAGZ E. coli K12 -----GPVMLDVEGY-----ELDAREEILAHPLVCGIILFTRNYHDPALRELVROTRAAASR-----RLVV
P96157 NAGZ V. furnissii 7225 -----GPLWLDFEGC-----ELTADDEREILAHPTVCGVILFARNYHDNQQLLALNTAIRQAAR-----BILI
KFD82021 NAGZ V. cholera -----GPLWLDFVAGY-----ELTSADREILQHPVGVILFCRNYHDNQQLLALNKAIRQAAR-----BILI
KFG78085 NAG3 M. anisopliae E6 MA---DLPLWQN-----GOMLI-MGWD-----GTEVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTARLVQELQTTAKNAGHPQPLLI
XP007818395 M. robertsii ARSEF 23 MA---DLPLWQN-----GOMLI-MGWD-----GTEVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTARLVQELQTTAKNAGHPQPLLI
XP008598947 B. bassiana ARSEF 2860 MTGAAEIDPIYQN-----GOTLI-MGWD-----GTEVTPQIRTLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTARLVQELQTTAQNAGHPQPLLI
XP006669831 C. militaris CM01 MTGAADIDPIYQN-----GQVLL-MGWD-----GIEVTPQIRTLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTARLVQELQTTAQNAGHPQPLLI
EHK44614 T. atroviride IMI 206040 MASAFELDPLWQN-----GOMLL-MGWD-----GTQVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAHTALLVQELQTTAKNSGHQPLLI
XP006966911 T. reesei QM6a MASAFDLPLWQN-----GOMML-MGWD-----GTQVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAHTALLVQELQTTAKNSGHQPLLI
EHK23853 T. virens Gv29-8 MASAFELDPLWQN-----GOMLL-MGWD-----GTQVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAHTAMLVQELQTTAKNSGHQPLLI
XP388571 F. graminearum PH1 MA---SDDPSWHD-----GOTLI-MGWD-----GTEVTPQIRTLIEDHHLGSIILTAKNLSK-----ELVQELQTTAKNAGHLQPLLI
ENH61856 F. oxysporum f.sp.cubense race1MA---SDDLPWQD-----GOTLI-MGWD-----GTEVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTAEVQELQTTAKNAGHLQPLLI
XP003053110 N. haematococca mpVI 77-13-4MA---ADLPIWQD-----GOTLI-MGWD-----GTEVTPQIRSLIEDHHLGSIILTAKNLSAQQTAEVQELQTTAKNAGHPQPLLI
XP003718403 M. oryzae 70-15 MA---LDALWQD-----GOMLI-MGWD-----GTEVTPQIRNLEIEHHLGSIILTAKNLSAHTARLVQELQTTARQAHPYPLLI
EAA31125 N. crassa OR74A ---MLI-MGWD-----GTEVTPQIRELITDHLGSIILTAKNLSAHTARLVQELQTTAHNAGHPYPLLI
XP747213 A. fumigatus Af293 MA---LPPGWED-----GOLFV-MGFD-----GTSVNPQIRSLIENYHLGSVLLTAKNLSAHTATRLVLELQTTARDAGHPVPLLI
XP001398206 A. niger CBS 513.88 MA---LPPGWED-----GOLFV-MGFD-----GTSVNPQIRSLIQDHLGSVLLTAKNLSAEDATRLVLELQTTARDAGHPVPLLI
XP659020 A. nidulans FGSC A4 MA---LPPGWDD-----GOLFV-MGFD-----GTSVSPQIRSLIQKHIGSVLLTAKNLSAEDATRLVLELQTTARDAGHPVPLLI
Q7WUL3 NAG3 C. fimi MS---IAWVRTT-----GOLFV-MGFD-----GTSVSPQIRSLIQKHIGSVLLTAKNLSAEDATRLVLELQTTARDAGHPVPLLI

```

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
KFG84234 <i>M. anisopliae</i> E6	GTGWMSCAV	LRALCLQDGLGI	YNSAFAGIT	TAGA	WSEHWR	RCKALGAE	SRDK	IDLALGPASGP	GAP	GRNAEGF	SDPYLQK
KFG86760 <i>M. anisopliae</i> E6	G-VDLIYPN	---FPGMCVSDAGNGL	FVNAY	EAGIHVGT	SWKDLARRRGA	AMGGE	FRRK	VNVLGPMVGP	PAWVV	GRNWEGFSV	DPYLSS
KFG85258 <i>M. anisopliae</i> E6	GFADPTCSV	---WHGLCLMDAGNGV	MVSAM	ASGLHWGAS	WDRMLTY	RGLWMA	RFFKAK	VNTALGPNAGPI	GTP	GRNWEGFSV	DPYLAGA
KFG81708 <i>M. anisopliae</i> E6	GTGIFMCSA	---FPQLCFNDGHNGV	NVTVF	PDGITGAT	FDKKIMYORAVA	IGKE	EARGK	VNVLGPTVGP	IKGP	GRNWEGF	ADPSLQAI
KFG84481 <i>M. anisopliae</i> E6	GADWHTKAT	---IPSLRMSDGPNGV	FAAC	PCGTALGS	TNQQLLE	EAGKKMG	EALAKSAH	TILGPTIN	MQSP	GRGFESI	EDPFLAGL
ACI15900 NAGA <i>T. maritima</i> MSB8	SSDHFGQQL	---SSPGNLAFG	KNSP	DVTYRYSR	VAGKIMEIV	LNMV	FAPVLD	LLEBSVIDIR	---	SYSDPKI	VAF
AAK16587 Cbsa <i>T. neapolitana</i>	SSDHFGQQL	---SSPGNLAAG	KVDPV	TGRYCE	MAGRIMNTL	CFNMV	FAPVLD	LLEKSVVDLR	---	SFSDPE	VVAS
BAA32403 NAGA <i>S. thermoviolaceus</i> OPC520	ATDOEHGIV	---LFPGAMAT	GAGS	TADARTL	GRTS	GALRAM	VDQDYS	DADVNP	VI	AD	DAVAR
AGC24356 <i>R. miehei</i> CAU432	AVDQENGV	---YLPGNM	ALCAL	SSSTAARN	VAMAT	SKELLTL	SMWNLAPVLD	VNMP	VI	QDP	ELVAR
MA128875 NAG4 <i>M. anisopliae</i> E6	GIDQENGLV	---OLPGMAL	GAAASLE	SAYHWAKAT	GNMERYFC	INMNYA	PVGD	VNEP	VI	DDADK	VAR
XP007823900 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	GIDQENGLV	---V---OLPGMAL	GAAASLE	SAYHWAKAT	GNMERYFC	INMNYA	PVGD	VNEP	VI	DDADK	VAR
XP007809270 <i>M. acridum</i> CQMa 102	GIDQENGLV	---V---OLPGMAL	GAAASLE	SAYHWAKAT	GNMERYFC	INMNYA	PVGD	VNEP	VI	DDADK	VAR
EHK46125 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	GIDQENGLV	---I---OQPGMT	LGAAT	GLSLOYA	EWAKAT	GGMLQYF	INMNYA	PVGD	INEP	QAE	TVSK
XP006969215 <i>T. reesei</i> QM6a	---ENGLV	---I---OQPGMT	LGAAT	GLSLOYA	EWAKAT	AEMLR	RYFC	INMNYA	PVGD	INEP	QAE
EHK20754 <i>T. virens</i> Gv29-8	GIDQENGLV	---V---OQPGMT	LGAAT	GLSLOYA	EWAKAT	AEMLR	RYFC	INMNYA	PVGD	INEP	QAE
XP008602406 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	GIDQENGLV	---V---OQPGMAL	AAAT	GLSLOYA	EWAKAT	AEMLR	RYFC	INMNYA	PVGD	INEP	QAE
XP006673913 <i>C. militaris</i> CM01	AIDQENGLV	---V---OLPGMAL	AAAT	GLSLOYA	EWAKAT	ADMLR	HF	INMNYA	PVAD	VNEP	NPQIVAR
XP754443 <i>A. fumigatus</i> Af293	---	---LP	GPMAL	GAT	HSP	EAYOV	GVVGET	IRFF	INMNYA	PVCD	INEP
XP001399892 <i>A. niger</i> CBS 513.88	GIDQENGLV	---V---OLPGMAL	GAAANS	PELAYOV	GAAT	GETLSAS	INMNYA	PVCD	INEP	DNPE	FVAR
P48823 HEXA <i>Alteromonas</i> sp. strain O7	AIDQENGRV	---SFTGNM	SI	GAT	PKYAT	KVVASA	IGKEL	NSL	INMNYA	PVVD	VNMP
P40406 NAGZ <i>B. subtilis subtilis</i> 168	SIDQENGRV	---NFPGNM	AL	GAARS	RINAY	OTGS	IIGKEL	SAL	INTDFS	PVVD	INMP
BAC56177 NAGZ <i>C. paraputrificum</i> M21	GFDEFGCSM	---	RT	SKGEL	GN	IND	SLATE	IGAK	KLKLL	INTDFS	IVLD
P75949 NAGZ <i>E. coli</i> K12	AVDQENGRV	QRFREGF	---	SF	---	AAL	S	OMEK	LAQ	BAGWLM	ASEMIAMD
P96157 NAGZ <i>V. furnissii</i> 7225	GVDQENGRV	QRFREGF	---	LY	---	AR	---	SD	LAEG	GGWLM	AAELIAH
KFD82021 NAGZ <i>V. cholera</i>	GVDQENGRV	QRFREGF	---	YY	---	AR	---	AE	E	LAE	GGWLM
KFG78085 NAG3 <i>M. anisopliae</i> E6	AVDQENGV	---	YVCO	FPSAM	CHAA	TGR	VELAYE	TYKAT	ASE	ISAC	VNLM
XP007818395 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	AVDQENGV	---	YVCO	FPSAM	CHAA	TGR	VELAYE	TYKAT	ASE	ISAC	VNLM
XP008598947 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	AVDQENGV	---	YVCO	FPSAM	CHAAA	GPS	E	ELAYE	VT	KAT	ATE
XP006669831 <i>C. militaris</i> CM01	AVDQENGV	---	FVCO	FPSAM	CHAAA	GPS	E	ELAYE	VT	KAT	ATE
EHK44614 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	AVDQENGV	---	FVCO	FPSAM	A	AA	T	GLS	LYE	VNK	AT
XP006966911 <i>T. reesei</i> QM6a	AVDQENGV	---	FVCO	FPSAM	A	AA	T	GLS	LYE	VNK	AT
EHK23853 <i>T. virens</i> Gv29-8	AVDQENGV	---	FVCO	FPSAM	A	AA	T	GLS	LYE	VNK	AT
XP388571 <i>F. graminearum</i> PH1	ALDQENGV	---	YVCO	FPSAM	G	VAA	T	G	RAD	LAYE	V
ENH61856 <i>F. oxysporum</i> f.sp.cubense racel	ALDQENGV	---	YVCO	FPSAM	G	VAA	T	G	RAD	LAYE	V
XP003053110 <i>N. haematococca</i> mpVI 77-13-4	ALDQENGV	---	YVCO	FPSAM	G	VAA	T	G	RAD	LAYE	V
XP003718403 <i>M. oryzae</i> 70-15	ALDQENGV	---	YICO	FPSAM	G	VAAA	NP	E	LAYE	VNK	AT
EAA31125 <i>N. crassa</i> OR74A	ALDQENGV	---	HICO	FPSM	G	VAAA	NP	E	LAYE	VNK	AT
XP747213 <i>A. fumigatus</i> Af293	ALDQENGV	---	YIRO	FPSAM	CHAA	TGS	KL	LA	H	E	V
XP001398206 <i>A. niger</i> CBS 513.88	ALDQENGV	---	YIRO	FPSAM	CHAA	TGS	KL	LA	H	E	V
XP659020 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	ALDQENGV	---	YIRO	FPSAM	CHAA	TGS	KL	LA	H	E	V
Q7WUL3 NAG3 <i>C. fimi</i>	SANLEGCAS	---	HVG	---	SNM	AA	T	ST	D	H	V

GH3 conserved sequence motif

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
...
KFG84234 <i>M. anisopliae</i> E6	GLANTVIGTQESVIA	CA	CH	IANEQEHFROAES	SNVD	DKT	LHEDYAWPFA	ATR	AG	CSIMCS
KFG86760 <i>M. anisopliae</i> E6	LVAQTIGVQSOQVQ	SL	CH	IANEQEMNRNPSGE	SNVD	DKT	MHEVYLWPFODGVR	AG	GNIMCS	
KFG85258 <i>M. anisopliae</i> E6	LGAETITMQEAGVMANL	CH	IANEQETYRRYFG	SNID	DKT	LHEVYLWPFMDGVK	AG	ASVMCS		MNGLLKGELGYQGFVM
KFG81708 <i>M. anisopliae</i> E6	VARETIKGVQEQVVIATI	CH	IGNEQEMYRMYNPV	ANID	DRT	LHEVYMWPFEGIH	AG	CSVMMA		INALLKDELGFGQGFVQ
KFG84481 <i>M. anisopliae</i> E6	GAAADVRIQTSTVQATI	CH	LCNDQEDKRM	SIVT	ERA	LREIYALPFO	LAVRDAR	GAFMTA		LDRLMRKEWGWGLIM
ACI15900 NAGA <i>T. maritima</i> MSB8	HGARACEEYLEGV	IPCI	CH		PCHG	SHI	ILPVVDAPF	EKLWEEDL	LPRKVL	EREKVTVMTA
AAK16587 Cbsa <i>T. neapolitana</i>	HMEACMAYFKGV	IPCI	CH		PCHG	SHY	LLPTVNAS	FEELWRED	LLPFRIF	QSRKTAVMTA
BAA32403 NAGA <i>S. thermoviolaceus</i> OPC520	MVAAGVKKYQGS	VAATA	CH		PCHG	SHI	GFVITHT	REOWETLDA	VPPRAA	KAG
AGC24356 <i>R. miehei</i> CAU432	MGLAQVEYQYQGV	VAISI	CH		PCHG	SHI	DVPVINK	TLEELDKTE	LVPFKAL	EAGC
MA128875 NAG4 <i>M. anisopliae</i> E6	FAAECAKELRETRV	VAPCI	CH		PCHG	SHY	GLPVVNK	TRGELE	EALVPPR	RRAA
XP007823900 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	FAAECAKELRETRV	VAPCI	CH		PCHG	SHY	GLPVVNK	TRELE	EALVPPR	RRAA
XP007809270 <i>M. acridum</i> CQMa 102	FAAECAKELRETRV	VAPCI	CH		PCHG	SHY	GLPVVNK	TRELE	EALVPPR	RRAA
XP006969215 <i>T. reesei</i> QM6a	FAAACTKGLREHK	VVPCICI	CH		PCHG	SHY	GLPVNKS	SRADMEKLE	LIPPRDAV	ADN
EHK20754 <i>T. virens</i> Gv29-8	FAAACTKGLREHK	VVPCICI	CH		PCHG	SHY	GLPVNKS	SRADMEKLE	LIPPRDAV	ADN
XP008602406 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	FAAACATMREH	CVVSCI	CH		PCHG	SHY	GLPSIDKS	RAOLDT	VLPFR	HAA
XP006673913 <i>C. militaris</i> CM01	FAAACAKMRGR	TVVPVCI	CH		PCHG	SHY	GLPRVDK	NREOLE	EATEL	IPPRQAV
XP754443 <i>A. fumigatus</i> Af293	FAASAAQGLREK	QKLI	IPSV	CH	PCHG	SHY	GLPVIEK	TREOLE	RCEL	IPPRFAV
XP001399892 <i>A. niger</i> CBS 513.88	FAASAAQGLREK	QKLV	PTV	CH	PCHG	SHY	GLPVIEK	TREOLE	RCEL	IPPRFAV
P48823 HEXA <i>Alteromonas</i> sp. strain O7	LGLAQVKAFAEA	AVLS	SAL	CH	PCHG	SHI	GLPRVDH	DRDKIN	QD	LLPFAEII
P40406 NAGZ <i>B. subtilis subtilis</i> 168	LGLYTMKGLQR	QDI	SAL	CH	PCHG	SHY	GLPLVSH	GQERL	REVE	IPPRQAV
BAC56177 NAGZ <i>C. paraputrificum</i> M21	FGINELKAIQNE	GVIP	TV	CH	PCHG	SHI	GLPSLN	NHDLN	RKSTEL	VPPQTAI
P75949 NAGZ <i>E. coli</i> K12	IASRFIDMHEA	SMK	TG	CH	PCHG	SHK	ETPC	CDPRP	QAEIRAKD	MSVSSLI
P96157 NAGZ <i>V. furnissii</i> 7225	YSSAYMRMKSV	QMAT	TG	CH	PCHG	SHI	ETPYDER		DSIADD	MTIFRAQI
KFD82021 NAGZ <i>V. cholera</i>	HSSAFLEMKAV	QMAT	TG	CH	PCHG	SHI	ETPYDER		EKIAQD	AI
KFG78085 NAG3 <i>M. anisopliae</i> E6	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP007818395 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP008598947 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP006669831 <i>C. militaris</i> CM01	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
EHK44614 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP006966911 <i>T. reesei</i> QM6a	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
EHK23853 <i>T. virens</i> Gv29-8	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP388571 <i>F. graminearum</i> PHI	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
ENH61856 <i>F. oxysporum</i> f.sp.cubense race1	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP003053110 <i>N. haematococca</i> mpVI 77-13-4	YGLAALNGIRD	AI	AAG	CH	PSYGENS	NSA	VPVIT	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP003718403 <i>M. oryzae</i> 70-15	YGLAAMNKYKAA	QVAT	CG	CH	PSYGENS	SSI	DIPII	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
EAA31125 <i>N. crassa</i> OR74A	YGLAAMNKYKAA	QVAT	CG	CH	PSYGENS	SSI	DIPII	QITLEEL	SLSAL	VPPRNAI
XP747213 <i>A. fumigatus</i> Af293	YGVFPMKQYKKA	GLVTCG	CH		PSYGENS	QTDVPI	IITLES	EQLSL	TALVPPRNAI	VHGLDSMMV
XP001398206 <i>A. niger</i> CBS 513.88	YGVFPMKQYKKA	GLVTCG	CH		PSYGENS	QTDVPI	IITLES	EQLSL	TALVPPRNAI	VHGLDSMMV
XP659020 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	YGVFPMKQYKKA	GLVTCG	CH		PSYGENS	QTDVPI	IITLES	EQLSL	TALVPPRNAI	VHGLDSMMV
Q7WUL3 NAG3 <i>C. fimi</i>	MGAEYVFAIQAQ	GLAASA	CH		PDCG	QHI	LASVNTMS	VEEWD	DFGVVY	RAAI

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
KFG84234 <i>M. anisopliae</i> E6	SDWQ	---AQH	CGAA	---TAVAG	LDMSM	---FWGGNLT	---NGTV	PAYR	DDMAMR	IM	---S	---K-QVVDVR
KFG86760 <i>M. anisopliae</i> E6	SDWG	---AQHAG	VAA	---TALAC	MDVM	---FWGDHLV	---NGSVP	SRV	TDMATRIL	---	TW	---DK-QPIEGR
KFG85258 <i>M. anisopliae</i> E6	IDWN	---AQH-NLN	---	SANAG	LDMLM	---FWGDNLT	---NTVK	EARV	TDMATRIL	---	AW	---DT-EPVDAR
KFG81708 <i>M. anisopliae</i> E6	SDWL	---AHMSG	VAA	---SALAG	LDMDM	---YWMYDLT	---NGSVP	MDRL	NDMATRVV	---	SW	---DE-RVVPVQ
KFG84481 <i>M. anisopliae</i> E6	SDWY	---GTYSTTP	---	AVVAG	LDLEM	---FRGEALK	---ASTNK	PFTH	VIDERVR	---	VL	---V-ET---
ACI15900 NAGA <i>T. maritima</i> MSB8	SDAMEMSAV	SNNFSVEEIVS	---	FLNACG	MIL	---YETL	---EDCKV	OKDK	VERSIRTV	---	---	---
AAK16587 Cbsa <i>T. neapolitana</i>	SDAMEMKAT	SENFSVEEAVRF	---	FLNACG	MIL	---YESL	---EDCSIE	ER	GKVERS	IKIV	---	---
BAA32403 NAGA <i>S. thermoviolaceus</i> OPC520	TDSL	CGE	VRTKY	CD	DRVPL	---	ALKAG	VD	QLLNPPS	---	FHAV	---RSC
AGC24356 <i>R. miehei</i> CAU432	TDCL	EMDAV	KETV	STPK	GALM	---	ALQAG	ND	MAMISHT	---	FKVL	---Q
MA128875 NAG4 <i>M. anisopliae</i> E6	TECL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALKAG	V	DNVMICHT	---	IDRV	---HAG
XP007823900 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	TDCM	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALKAG	V	DNVMICHT	---	IDRV	---HAG
XP007809270 <i>M. acridum</i> CQMa 102	TDCL	EMDAV	RAGCG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHS	---	IDRV	---HAG
EHK46125 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDHV	---TAG
XP006969215 <i>T. reesei</i> QM6a	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDHV	---TAG
EHK20754 <i>T. virens</i> Gv29-8	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDHV	---TAG
XP008602406 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDRL	---DAG
XP006673913 <i>C. militaris</i> CM01	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDRV	---ET
XP754443 <i>A. fumigatus</i> Af293	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDRV	---ET
XP001399892 <i>A. niger</i> CBS 513.88	TDCL	EMDGV	RAAYG	TV	GALM	---	ALQAG	V	DNVMICHT	---	IDRV	---ET
P48823 HEXA <i>Alteromonas</i> sp. strain O7	TDAL	DMAGH	SDF	FNPVD	ATIE	---	TFNAG	V	I	ALMPRN	---	MAQL
P40406 NAGZ <i>B. subtilis subtilis</i> 168	TDA	LNKAT	ADHF	Q	EEAVVM	---	AVKAG	V	D	I	ALMPTS	---
BAC56177 NAGZ <i>C. parapatrificum</i> M21	TDDL	EMOAL	SKNWD	L	GEAAK	---	SVEAC	A	D	I	L	V-HT
P75949 NAGZ <i>E. coli</i> K12	SDDL	SMEG	---	AAIM	GSYAER	QASLD	D	A	C	D	M	I
P96157 NAGZ <i>V. furnissii</i> 7225	SDDL	SMEG	---	AAIM	GGAERA	QASLD	D	A	C	D	M	V
KFD82021 NAGZ <i>V. cholera</i>	SDDL	SMEG	---	AAVM	G	GP	V	E	R	S	H	Q
KFG78085 NAG3 <i>M. anisopliae</i> E6	SECL	EMEA	SHDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	L	V	L
XP007818395 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	SECL	EMEA	SHDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	L	V	L
XP008598947 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	SECL	EMEA	SHDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	L	V	L
XP006669831 <i>C. militaris</i> CM01	SECL	EMEA	SHDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	L	V	L
EHK44614 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	SECL	EMEA	SQDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	I	I	L
XP006966911 <i>T. reesei</i> QM6a	SECL	EMEA	SQDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	I	I	L
EHK23853 <i>T. virens</i> Gv29-8	SECL	EMEA	SQDL	GV	QNVVM	---	AVEA	C	D	I	I	L
XP388571 <i>F. graminearum</i> PH1	SECL	EMEA	SHEL	GV	QNVIM	---	AVEA	C	D	L	V	L
ENH61856 <i>F. oxysporum</i> f.sp.cubense race1	SECL	EMEA	SHEL	GV	QNVIM	---	AVEA	C	D	L	V	L
XP003053110 <i>N. haematococca</i> mpVI 77-13-4	SECL	EMEA	SHEL	GV	QNVIM	---	AVEA	C	D	L	V	L
XP003718403 <i>M. oryzae</i> 70-15	SECL	EMEA	SHEL	GV	QNVIM	---	AVEA	C	D	L	V	L
EAA31125 <i>N. crassa</i> OR74A	SECL	EMEA	ARTE	MG	VRTG	TIM	---	AVQ	A	C	D	L
XP747213 <i>A. fumigatus</i> Af293	SECL	EMEA	THNI	CG	VGG	STM	---	AKN	A	C	D	I
XP001398206 <i>A. niger</i> CBS 513.88	SECL	EMEA	THNI	CG	VGG	STM	---	AKN	A	C	D	I
XP659020 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	SECL	EMEA	THNI	CG	VGG	STM	---	AKN	A	C	D	I
Q7WUL3 NAG3 <i>C. fimi</i>	SDST	TMAG	ASV	L	PRS	QAVPR	---	V	A	A	C	D


```

          710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
KFG84234 M. anisopliae E6 -----GTLPD-----AVVFVD-----TDDLKKNVSSICHNTIVVIHSVGPVLVTDWYQNPNIS
KFG86760 M. anisopliae E6 -----FGTIPY-----CIVFG-----DSLVKTVADQCNKTVVVLHNAGPRIVESFVDHPNVT
KFG85258 M. anisopliae E6 -----GTIPL-----CLVFI-----DALVNNVASKCANTIAVVHAAGIRLVDRWIEHPNVT
KFG81708 M. anisopliae E6 -----GTLPI-----ALVFI-----YDQLVKDVASKYKNVIVVAHTVGPMLLEKWLDPVAVK
KFG84481 M. anisopliae E6 -----YPKVKLVD-----SVVII-----KDQLITQVAAANSNTAVVMQGTGTPEEM--PWLE--KTP
ACI15900 NAGA T. maritima MSB8 -----
AAK16587 Cbsa T. neapolitana -----
BAA32403 NAGA S. thermoviolaceus OPC520 -----
AGC24356 R. miehei CAU432 -----
MA128875 NAG4 M. anisopliae E6 -----
XP007823900 M. robertsii ARSEF 23 -----
XP007809270 M. acridum CQMa 102 -----
EHK46125 T. atroviride IMI 206040 -----
XP006969215 T. reesei QM6a -----
EHK20754 T. virens Gv29-8 -----
XP008602406 B. bassiana ARSEF 2860 -----
XP006673913 C. militaris CM01 -----
XP754443 A. fumigatus Af293 -----
XP001399892 A. niger CBS 513.88 -----
P48823 HEXA Alteromonas sp. strain O7 -----
P40406 NAGZ B. subtilis subtilis 168 -----
BAC56177 NAGZ C. paraputrificum M21 -----
P75949 NAGZ E. coli K12 -----
P96157 NAGZ V. furnissii 7225 -----
KFD82021 NAGZ V. cholera -----
KFG78085 NAG3 M. anisopliae E6 STGALYGFVATYFIAGVGIIGALL----VDPSKRNVSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPLK----
XP007818395 M. robertsii ARSEF 23 STGALYGFVATYFIAGVGIIGALL----VDPSKRNVSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPLK----
XP008598947 B. bassiana ARSEF 2860 STQALYGFVATYATGGVILGALI----VDPSKRNVSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPLK----
XP006669831 C. militaris CM01 STQALYGFVATYVTGAVGILGALI----VDPTKRNVSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPLK----
EHK44614 T. atroviride IMI 206040 STQALYGFVATYVQNVGMLGALV----VDPTKRNLSIGRSLHRRALK----PSLFLGIPLK----
XP006966911 T. reesei QM6a STQALYGFVATYVQNVGILGALI----VDPTKRNMSIGRSLHRRALK----PALFLGIPLK----
EHK23853 T. virens Gv29-8 STQALYGFVATYFIQNVGILGALI----VDPTKRNLSIGRSLHRRALK----PALFLGIPLK----
XP388571 F. graminearum PH1 STNALYGFVATYIHGVMIGGVF----VEPTKRDVSIIGRSLHRRALK----PGVFLGIPVK----
ENH61856 F. oxysporum f.sp.cubense race1 STNALYGFVATYFVHGVLGGVF----VEPTKRDVSIIGRSLHRRALK----PGVFLGIPVK----
XP003053110 N. haematococca mpVI 77-13-4 STGALYGFVATYFVHGVLGGVF----VDPSKRDVSIIGRSLHRRALK----PGVFLGIPVK----
XP003718403 M. oryzae 70-15 STKALYGFVATYCIIEGVGIIIGSIF----VDPSKRNVSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPVK----
EAA31125 N. crassa OR74A STGALYGFVATYIIEGVGIIIGSIF----VDPSKRNLSIGRSLHRRALK----PGVFLGIPVK----
XP747213 A. fumigatus Af293 STQALYGFVATYFFRSTGVIGSLI----VDPARRKLSIGRSLHRRALK----PGIYLGIP-R-
XP001398206 A. niger CBS 513.88 STQALYGFVATYFFRSTGVIGSLI----VHPARRKLSIGRSLHRRALK----PGIYLGIP-R-
XP659020 A. nidulans FGSC A4 TTRALYGFVATYFRATGVIGSLI----VDPSRRRLSIGRSLHRRALK----PGIYLGIP-R-
Q7WUL3 NAG3 C. fimi -----F-----VD-----EG--MAAP-V-----

```

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
KFG84234 <i>M. anisopliae</i> E6	AIVITDILYGKTS-	GRSPFTWQQDFTEGSF	IDYRHFDDKKNSTPIYEF	FGHGLSWSTFEY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG86760 <i>M. anisopliae</i> E6	AIILVKLLYGEAGFGKLSYTVQSNFTEGVYLDYKYFEMHNITPRYEF	FGFGLSYTTFSL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG85258 <i>M. anisopliae</i> E6	AAAILVKLLYGEANFGKLPYTLQCDFTEGVYLDYRAFDEGNVTPRYE	FGYGLSYTTFSY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG81708 <i>M. anisopliae</i> E6	SVLLADVLFGEVSPGHLPYSIHQDYTEGLYIDYRWLNKNNIKPRYAF	FGHGLSYTNFTY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG84481 <i>M. anisopliae</i> E6	AVVIADILFGDANPGKLSLSF---	YGEDVYMGYRYYEFANRAVNF	PFHGLSYTSFSF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ACI15900 NAGA <i>T. maritima</i> MSB8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AAK16587 Cbsa <i>T. neapolitana</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BAA32403 NAGA <i>S. thermoviolaceus</i> OPC520	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AGC24356 <i>R. miehei</i> CAU432	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MA128875 NAG4 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP007823900 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP007809270 <i>M. acridum</i> CQMa 102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EHK46125 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP006969215 <i>T. reesei</i> QM6a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EHK20754 <i>T. virens</i> Gv29-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP008602406 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP006673913 <i>C. militaris</i> CM01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP754443 <i>A. fumigatus</i> Af293	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XP001399892 <i>A. niger</i> CBS 513.88	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P48823 HEXA <i>Alteromonas</i> sp. strain O7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P40406 NAGZ <i>B. subtilis subtilis</i> 168	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BAC56177 NAGZ <i>C. paraputrificum</i> M21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P75949 NAGZ <i>E. coli</i> K12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P96157 NAGZ <i>V. furnissii</i> 7225	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFD82021 NAGZ <i>V. cholera</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG78085 NAG3 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMI IHNLPNWVAPEGLLQSIQRANISFDLIHGLENAESVLH
XP007818395 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMI IHDLPNWVAPEGLLQSIQRANISFDLIHGLENAESVLH
XP008598947 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMMIADLGSWTAPEGLLPTIQRANISFDLIHGLDNADTVLH
XP006669831 <i>C. militaris</i> CM01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMVIADLGGWTAPEGLLPTIQRANISFDLIHGLDNAETVLH
EHK44614 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMI IQDLSAWYAPEGLSQSIQRANISFDLIYGVESGDTVMH
XP006966911 <i>T. reesei</i> QM6a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMVIQDLSAWYAPEGLSQSIQRANISFDLIYGVESGDTVMH
EHK23853 <i>T. virens</i> Gv29-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMI IHDL SAWYAPEGLSQSIQRANISFDLIYGVESGDTVMH
XP388571 <i>F. graminearum</i> PH1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	SNMVIQDLANWSAPEGLSQSIQRAGISFDLIHGLDNADGVLS
ENH61856 <i>F. oxysporum f.sp.cubense</i> racel	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	SNMILREVASWSAPEGLSQSIQRAGISFDLIHGLDNADGVLS
XP003053110 <i>N. haematococca</i> mpVI 77-13-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TNMIIQDLPNWSAPEGLLQSIQRANISFDLIHGLDNGDGVLS
XP003718403 <i>M. oryzae</i> 70-15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TSLAIADLPSWGAPEGLLQSIQRANISFDLIHGLESGETVLA
EAA31125 <i>N. crassa</i> OR74A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	YNLLPQLTWSPPDLPPTLQLAGISFDLIIPGLAEQESVLS
XP747213 <i>A. fumigatus</i> Af293	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CSVVLRLNLTWTPPDGLIQQGLKNADVSYDLVHGWDYAEPIID
XP001398206 <i>A. niger</i> CBS 513.88	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CSVVLRLNLTWTPPDGLIIFGLQNADVSYDLVHGWDYADSIID
XP659020 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CNVALRLNLTWSPPEGLVNSLQSDAVYDLVHGWDYADSIID
Q7WUL3 NAG3 <i>C. fimi</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	EWAEPMGYVHSVPTVVFVSFENPYHLD----VP

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
KFG84234 <i>M. anisopliae</i> E6
KFG86760 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	STAQLWDVVYTVSATITEIPQLYISL	-----	-----
KFG85258 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	DLFDNIATVTVDVSEVPQLYVGI	-----	-----
KFG81708 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	DLWDIVARVSTTVTEVAQLYLGI	-----	-----
KFG84481 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AVKSLWDVAYKLSVVVTASVQAYLQF	-----	-----
ACI15900 NAGA <i>T. maritima</i> MSB8	-----	-----	-----	-----	FVLRNPF	-----	-----	ALK-----	VKEVAQMYIKP	-----
AAK16587 Cbsa <i>T. neapolitana</i>	-----	-----	-----	-----	FIIRNPF	-----	-----	-----	-----	-----
BAA32403 NAGA <i>S. thermoviolaceus</i> OPC520	-----	-----	-----	-----	VAVRNPYDYSWTDVEVRAAARVVAGRVSPRGTVPV	-----	-----	-----	-----	-----
AGC24356 <i>R. miehei</i> CAU432	-----	-----	-----	-----	AAVMNPYDYEYTPPAHEAAVRLIFGEIETRSRLPI	-----	-----	-----	-----	-----
MA128875 NAG4 <i>M. anisopliae</i> E6	-----	-----	-----	-----	VATCSPYDYEPTLEAFASAADI IYGAATAKGRLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP007823900 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	-----	-----	-----	-----	VATCSPYDYEPTLEAFASAADI IYGAATARGTLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP007809270 <i>M. acridum</i> CQMa 102	-----	-----	-----	-----	VATCNPYDYEPTLEAFASAADI IYGAATARGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
EHK46125 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	-----	-----	-----	-----	VATCAPYDYEPTVEAFSAAVDLLFGDAQPRGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP006969215 <i>T. reesei</i> QM6a	-----	-----	-----	-----	IATCAPYDYEPTVEAFSAAVDILFGDAQPRGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
EHK20754 <i>T. virens</i> Gv29-8	-----	-----	-----	-----	IATCAPYDYEPTVEAFSAADILFGDAQPRGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP008602406 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	-----	-----	-----	-----	IATCAPYDYEPTLEAFRAAVDI IYIGIDTARGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP006673913 <i>C. militaris</i> CM01	-----	-----	-----	-----	IATCAPYDYEPTLEAFRAAVDVIYDVETAKGKLPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP754443 <i>A. fumigatus</i> Af293	-----	-----	-----	-----	IAACSPYDYEPTIEAFTAAANILFGAII PKGALPV	-----	-----	-----	-----	-----
XP001399892 <i>A. niger</i> CBS 513.88	-----	-----	-----	-----	IAACNPYDYEPTPEAFAAAAEVI FGKSEPKGILPV	-----	-----	-----	-----	-----
P48823 HEXA <i>Alteromonas</i> sp. strain O7	-----	-----	-----	-----	ISLRAPYEYAVAGPAYTALAKVILGLIAKAEGSLPV	-----	-----	-----	-----	-----
P40406 NAGZ <i>B. subtilis subtilis</i> 168	-----	-----	-----	-----	MSLRNPYDYGYPNIIPAGVMAIFGQAKPKGTLPV	-----	-----	-----	-----	-----
BAC56177 NAGZ <i>C. paraputrificum</i> M21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P75949 NAGZ <i>E. coli</i> K12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P96157 NAGZ <i>V. furnissii</i> 7225	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFD82021 NAGZ <i>V. cholera</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KFG78085 NAG3 <i>M. anisopliae</i> E6	HVRANANPEVLELYTYALSENKTCGIVRAKDPSGNLIGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTY-----	-----	IP-----
XP007818395 <i>M. robertsii</i> ARSEF 23	HVRANANPEVLELYTYALSENKTCGIVRAKDPSGNLIGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTY-----	-----	IP-----
XP008598947 <i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	HVRTESGPVEVLELYRYALAEKTCGIVRAKDPSGNIMGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTY-----	-----	IP-----
XP006669831 <i>C. militaris</i> CM01	HVRTESGPVEVLELYRYALAEKTCGIVRAKDPAGAIMGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTY-----	-----	IP-----
EHK44614 <i>T. atroviride</i> IMI 206040	HVRTHANPEVLELYRAALEESKACGIVRAKDAAGNLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LRY-----	-----	VP-----
XP006966911 <i>T. reesei</i> QM6a	HVRTHANPEVLELYRTALEESKACGIVRAKDAAGNLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LRY-----	-----	VP-----
EHK23853 <i>T. virens</i> Gv29-8	HVRTHANPEVLELYRTALEESKACGIVRAKDAAGNLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LRY-----	-----	VP-----
XP388571 <i>F. graminearum</i> PH1	HVRNHASPEVLELYRHALSETKLSGIVRAKDASGNLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTY-----	-----	YP-----
ENH61856 <i>F. oxysporum</i> f.sp.cubense race1	HVRNANPEVLELYRHALSDSKLSGIVRAKDATGTLTLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTH-----	-----	IP-----
XP003053110 <i>N. haematococca</i> mpVI 77-13-4	HVRTHANAEILELYRYALS DNKSCGIVRAKDATGNLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTH-----	-----	VP-----
XP003718403 <i>M. oryzae</i> 70-15	HVRAHANPEVQELYRAALEETKTCGVVRAKGNNDTLTLLGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LTH-----	-----	LP-----
EAA31125 <i>N. crassa</i> OR74A	FVSSHSTPEILTLRYLALLQSNNTWI IRAKGGAEQVIGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	L-H-----	-----	LP-----
XP747213 <i>A. fumigatus</i> Af293	HIKTNSRQGLIDYKIALGGAPNCGI IRATRPSDGILGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LEH-----	-----	MP-----
XP001398206 <i>A. niger</i> CBS 513.88	HIKTNSRQGVIDIYRVALGGAPHCGI IRATRPGDGLGS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LEH-----	-----	MP-----
XP659020 <i>A. nidulans</i> FGSC A4	HVKTNSRQGVIDIYKIALGGAPHCGI IRARRPHDGLGS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LEH-----	-----	MP-----
Q7WUL3 NAG3 <i>C. fimi</i>	RVRT-----	-----	-----	-----	LINTYGSPPVLET	-----	-----	-----	-----	F-----


```

.....|...
KFG84234 M. anisopliae E6          FVGSSSRN
KFG86760 M. anisopliae E6          YVGTSSRD
KFG85258 M. anisopliae E6          FVGASSRD
KFG81708 M. anisopliae E6          WLGGASDD
KFG84481 M. anisopliae E6          IISDSSRD
ACI15900 NAGA T. maritima MSB8      -----
AAK16587 CbsA T. neapolitana      -----
BAA32403 NAGA S. thermoviolaceus OPC520 -----
AGC24356 R. miehei CAU432          -----
MAL28875 NAG4 M. anisopliae E6     -----
XP007823900 M. robertsii ARSEF 23  -----
XP007809270 M. acridum CQMa 102   -----
EHK46125 T. atroviride IMI 206040 -----
XP006969215 T. reesei QM6a        -----
EHK20754 T. virens Gv29-8         -----
XP008602406 B. bassiana ARSEF 2860 -----
XP006673913 C. militaris CM01     -----
XP754443 A. fumigatus Af293       -----
XP001399892 A. niger CBS 513.88   -----
P48823 HEXA Alteromonas sp. strain O7 -----
P40406 NAGZ B. subtilis subtilis 168 -----
BAC56177 NAGZ C. paraputrificum M21 -----
P75949 NAGZ E. coli K12           -----
P96157 NAGZ V. furnissii 7225     -----
KFD82021 NAGZ V. cholera          -----
KFG78085 NAG3 M. anisopliae E6     -----
XP007818395 M. robertsii ARSEF 23  -----
XP008598947 B. bassiana ARSEF 2860 -----
XP006669831 C. militaris CM01     -----
EHK44614 T. atroviride IMI 206040 -----
XP006966911 T. reesei QM6a        -----
EHK23853 T. virens Gv29-8         -----
XP388571 F. graminearum PH1       -----
ENH61856 F. oxysporum f.sp.cubense racel1 -----
XP003053110 N. haematococca mpVI 77-13-4 -----
XP003718403 M. oryzae 70-15       -----
EAA31125 N. crassa OR74A          -----
XP747213 A. fumigatus Af293       -----
XP001398206 A. niger CBS 513.88   -----
XP659020 A. nidulans FGSC A4      -----
Q7WUL3 NAG3 C. fimi               -----

```

Figure S2. Multiple alignment of GH3 NAGases from bacteria, zygomycetes, filamentous fungi, and *M. anisopliae* β -glucosidases. Amino acid alignment built and trimmed with GUIDANCE2 using PRANK as the MSA algorithm with 100 bootstrap replicates. Location of the GH20 conserved sequence motif (K-H-F/I-P-G-H/L-G-x-x-x-D-S/T-H) is highlighted.

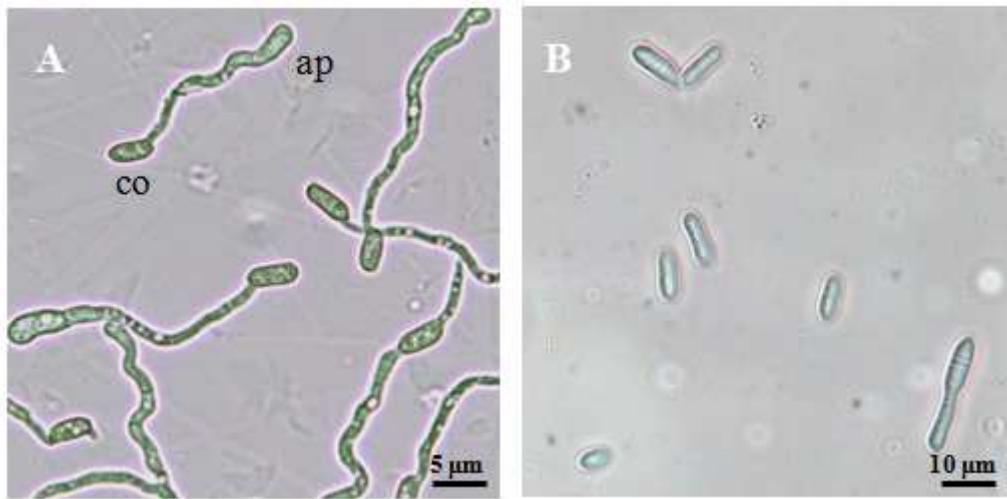


Figure S3. Major *Metarhizium anisopliae* cell types involved in the cycle of infection and analyzed in this study. (A) A germinating conidium producing an appressorium, induced over glass coverslips; (B) Budding yeast-type cells (blastospores) produced by the fungus to facilitate dispersal in insect hemocoel. co: conidium; ap: appressorium.

MaNAG4 nucleotide sequence

ATGAGACCCTCTATCATTTGCGACCGAGACGCCTCTCGACCCCTCACTGGAGGTGTCCAACCGTCAACTCGGA
 ACATCAAACCAGCTCCAACCCCTCATCTTCCCCACGGACCCGGCATGCATGGGGCTCTTTGCGGTTGGCTTCTA
 CGGGACCGAAATCAACAAAGAAATCAAGTCTCTCATCCAAGACTATGGCGTGGGCGCCGTTCTCCTCTTCAAG
 CGCAACATCAAAGACGCCGCCAGCTACAAGCTCTCTGCCCTGGGACTTCAACAACCTGGCCCAGGATGCCGGCC
 ACACCCAGCCTCTCTTTGTGCGCATCGACCAGGAAAACGGACTCGTGACGCGCATTTCACCTCCAGTCGCGGC
 ACAGCTGCCCGGACCAATGGCCCTGGGCGCCGCCGCATCGTTGGAGAGCGCATAACCAGTCGCCAAAGCCACG
 GGCAACATGTTGCGCTATTTGCGCATCAACATGAATTACGCCCCAGTCGGCGACGTCAATAACGAGCCGCTGA
 ACCCCGTCATTGGCGTACGGAGTCCCGGCGACGACGCCGACAAGGTGCGCCGATTTGCCGCCGAGTGTGCCAA
 GGGCCTGCGAGAGACCAGAGTCGCGCCCTGCATCAAGCACTTCCCGGGCCACGGGGACACGGCCGTAGATTTCG
 CACTACGGCCTGCCCGTCTCAACAAGACCAGGGGGGAGCTGGAAGCGCTGGAGCTGGTGCCCTTTGCCCGCG
 CGGCCGAGAGGGCATCGAGATGGTCATGACGGCGCACATTGCCCTCCCCAAGGCGAGCGGCTCGCATCTGCC
 CGCCACTCTGTCCCCCGAGACGATCAAGATCCTGCGCGAGGACCTCGCGTTCGAGGGCGTCATCATGACCGAA
 TGTCTGGAAATGGACGGCGTTCGAGCCGCATACGGAACCGTAGAGGGCGCCCTCATGGCGCTCAAGGCGGGCG
 TCGACAATGTCATGATTTGCCACACGTACGACGTGCAAGCTGCTTCCATCGACCGCGTCTGCGAGGCCGTCCA
 TGCCGGAGAGCTGTCCAGGCACGGCTCGACGCATCTCTCAAGCGGCTGCGCGACCTCAAGGACAAGTACACA
 AGCTGGGACACGGCACTGGAAGCCCGGCCCATCGGACCTGGCCCGCTGAGCACGGAGAACGAGGCCCTCG
 CCCACGACATTTACGCCAACGCCACCACGGTTGTCCGGTCGGAAGCAGGCCCTTTGCCCGTGTCCAGAAGCGC
 CAGCACGGTATTCGTCTCGCCGGGCGTCAACGTTCCACCAGCGGCGCCGCGTCCAGCGGGGAGGAGCTGCAG
 AAGACGCGCGTGCCCTGGGTTTCCGGCGCCTTTGGCGACTCCCTCCGCAGGTACAACCCTGCTGTTGAGGACA
 TTCGCTTACAGAGTCTACCTTGACGCCGGAGCAGTGGGGGCGGGTGGAGGACGCGGCCGTTGGTCTTTTGGC
 GACGAGAAACCGGAGGGAGTCGCAGTACCAGCGGAGTCTGGGGCTGGAGATTGCCAGGCGGGCGGGCGGGCAGG
 ACGCTCGTCGCGGTGGCTACCTGCAGTCCGTATGACTTTATCGACGACGAGGCCGAGGTGAGGAATTATATTG
 CCGTGTATGAGCCTACTCTGGAGGCATTTGCGTCCGGCGCCGACATTTATTTACGGCGCGGCCACGGCCAAGGG
 TAGACTGCCTGTTGCTCACTAG

MaNAG4 amino acid sequence

MRPSIIICDRDASRPLTGGVQPSTRNIKPAPTLIFPTDPACMGLFAVGFYGTINKEIKSLIQDYGVGAVLLFK
 RNIKDAAQLQALCLGLQQLAQDAGHTQPLFVGLDQENGLVTRISPPVAAQLPGPMALGAAASLESAYHVAKAT
 GNMLRYFGINMNYAPVGDVNNEPLNPVIGVRSPGDDADKVARFAECAKGLRETRVAPCIKHFPGHGDVAVDS
 HYGLPVVKNTRGELEALELVPFRRAAAEGIEMVMTAHIALPKASGSHLPATLSPETIKILREDLAFEGVIMTE
 CLEMDGVRAAYGTVEGALMALKAGVDNVMICHTYDVQAASIDRVCEAVHAGELSQARLDASLKRRLDLKDKYT
 SWDTALEARPPSDLARLSTENEALAHDIYANATTVVRSEAGLLPVSRASSTVFVSPGVNVPSTGAASSGEELQ
 KTRVPWVSGAFGDSLRRYNPAVEDIRFTESTLTPEQWGRVEDAAVVVLATRNARESQYQRLGLEIARRRAGR
 TLVAVATCSPYDFIDDEAEVRNYIAVYEPTLEAFASAADI IYGAATAKGRLPVAH

Fig S4. *MaNAG4* nucleotide and amino acid sequence.

Table S1. Primer sequences used in qPCR to target *M. anisopliae* GH20 and GH3 NAGase genes and reference gene.

Acronym	Gene description	Accession number	Forward/Reverse primer sequences (5'-3')
NAG1	putative NAGase GH20	KFG80340	TCCAGCAACTCGTCATCTTC / AGGCAAGTCCGTCAATCTG
NAG2	putative NAGase GH20	KFG85702	CGGCGAGACCAAAGAGTC / CATCCACGGCACAAGAC
NAG3	putative NAGase GH3	KFG78085	CCGAATGTCTGGAAATGGAGGC / CGTCTGATGGATGTGAAGATGCG
NAG4	putative NAGase GH3	MANI128875	TCTGTCCCCCGAGACGATCAAG / CATGACATTGTCGACGCCCCG
TEF1 α	Translation elongation factor 1- α	AY445082	CGGCAAGTCTACCACCACTG / TGATACCACGCTCACGCTC

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

5. CAPÍTULO II: Análise funcional dos genes de β -N-acetilglicosaminidases das famílias GH20 e GH3 em *Metarhizium anisopliae*

Resultados preliminares da construção de vetores para geração de mutantes nulos para a análise funcional dos genes MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 de *M. anisopliae*.

5.1. INTRODUÇÃO

Quitina é um polissacarídeo linear composto de unidades de GlcNAc unidas por ligações β -(1,4). Em fungos filamentosos, a quitina está localizada nas camadas internas da parede celular, próxima à membrana plasmática (RUIZ-HERRERA, 2012) e forma, juntamente com glicanas β -(1,3-1,6) a estrutura da parede celular fúngica (LATGÉ, 2007). Na biosfera, a quitina também é encontrada no exoesqueleto de artrópodes, sendo o segundo biopolímero mais abundante na natureza (ficando atrás somente da celulose), com renovação natural estimada em 10 toneladas por ano (MUZZARELLI, 1999). Contudo, a quitina visivelmente não acumula na biosfera, o que indica sua reciclagem de forma eficiente por microrganismos.

A análise de genomas fúngicos mostra que fungos filamentosos exibem um grande repertório de enzimas quitinolíticas extracelulares. Eles comumente possuem entre 10 e 35 quitinases pertencentes à família GH18 (SEIDL, 2008). O genoma de diversas espécies de fungos que parasitam artrópodes (entomopatógenos), por exemplo, *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *C. militaris*, e o genoma de fungos micoparasitas, por exemplo, *Trichoderma* sp., são particularmente ricos em genes que codificam quitinases (SEIDL et al., 2005; GAO et al., 2011; KUBICEK et al., 2011; ZHENG et al., 2011; XIAO et al., 2012; JUNGES et al., 2014; AGRAWAL et al., 2015). O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* linhagem E6 possui 21 genes que codificam para quitinases (JUNGES et al., 2014).

Quitinases não estão somente envolvidas na degradação de quitina extracelular, mas também em processos como remodelamento da parede celular durante o crescimento fúngico e desenvolvimento assexual, assim como na degradação da parede celular durante autólise e apoptose. As funções de quitinases nesses processos têm sido estudadas em

diversas espécies, por exemplo, *A. nidulans* (PUSZTAHELYI et al., 2006; EMRI et al., 2008; PÓCSI et al., 2009; SHIN et al., 2009), *Neurospora crassa* (TZELEPIS et al., 2012), *T. atroviride* e *T. virens* (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012) e *Penicillium chrysogenum* (SÁMI et al., 2001; KAMEREWERD et al., 2011; PUSZTAHELYI; PÓCSI, 2014). Os dados sugerem que várias quitinases possuem mais de uma função e estão envolvidas na degradação de quitina extracelular, assim como no remodelamento e reciclagem de quitina da parede celular durante diferentes estágios de desenvolvimento (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

A partir dessa ampla gama de diferentes quitinases, a via de degradação da quitina, comumente, se reduz a duas NAGases (SEIDL, 2008). A degradação completa da quitina, até a liberação de monômeros GlcNAc, somente é possível pela ação destas enzimas. Desta forma, monômeros de GlcNAc podem ser reciclados para constituição de novas fibrilas de quitina ou podem ser utilizados como fonte de carbono pelas vias do metabolismo energético celular.

Apesar do conhecimento adquirido com o estudo de quitinases em *Metarhizium*, pouco se sabe sobre o papel das NAGases neste organismo modelo. O genoma de *M. anisopliae* E6 exibe 2 genes de NAGases pertencentes às glicosil hidrolases da família 20 (GH20) (Capítulo 1 desta Tese). Nenhum estudo de caracterização funcional desses 2 genes em *M. anisopliae* foi realizado até o momento; entretanto, estudos de genes ortólogos em outros fungos filamentosos demonstram sua atividade quitinolítica e sua essencial presença para o crescimento do fungo em meio contendo quitina como fonte de carbono. Em *T. atroviride*, foi demonstrado que a presença de qualquer uma das duas de suas NAGases é essencial para a conversão de quitobiose à GlcNAc e para seu crescimento em quitina (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009).

As duas NAGases GH20 de *M. anisopliae*, MaNAG1 e MaNAG2, têm sua expressão induzida quando o fungo é cultivado em meio suplementado com quitina, entretanto, MaNAG1 apresenta indução mais acentuada nessa condição. Ainda, MaNAG1 e MaNAG2 possuem peptídeo sinal para secreção e, provavelmente, agem na conversão extracelular de dímeros de GlcNAc em monômeros para assimilação desta fonte de carbono (Capítulo 1 desta Tese).

Além das duas NAGases GH20, a biomineração realizada no genoma de *M. anisopliae* E6 encontrou dois genes ortólogos às NAGases de bactérias pertencentes à família 3 das glicosil hidrolases (GH3), sendo denominadas MaNAG3 e MaNAG4 (Capítulo 1 desta Tese). NAGases da família GH3 formam um pequeno grupo de enzimas bacterianas que possuem um amplo espectro de funções dependendo do organismo. Em bactérias marinhas quitinolíticas como *V. furnissii* ou *Alteromonas* sp., NAGases participam na degradação de quitina e na indução de quitinases (TSUJIBO et al., 1994; KEYHANI; ROSEMAN, 1996). Em bactérias gram-negativas, foi encontrado o gene NagZ, uma NAGase da família GH3 que hidrolisa as ligações glicosídicas β -1,4 entre GlcNAc e ácido anidro-N-acetilmurâmico nos produtos de degradação da parede celular, demonstrando sua importância dentro da célula durante o processo de reciclagem de muropeptídeos da parede celular bacteriana (CHENG et al., 2000). Em fungos, a única NAGase GH3 descrita até o momento foi encontrada no zigomiceto *R. miehei*, onde a enzima apresentou atividade hidrolítica sobre N-acetil-quitoligossacarídeos (GlcNAc)₂₋₃ (YANG et al., 2014). A análise do perfil transcricional dos genes das NAGases GH3 de *M. anisopliae* mostrou que MaNAG3 e MaNAG4 apresentaram expressão induzida por substratos quitinosos (GlcNAc 0.25%), e em tipos celulares específicos do ciclo de vida do fungo. Por exemplo, MaNAG3 apresentou expressão induzida em conídio, blastosporo e

apressório. Além disso, MaNAG3 teve transcrição induzida em autólise (Capítulo 1 desta Tese). Portanto, as NAGases de *M. anisopliae* apresentaram perfis transcricionais distintos em resposta a diferentes condições, indicando a ausência de um padrão de regulação gênica. Estes perfis de expressão variáveis também sugerem que elas não devem possuir funções totalmente redundantes.

O grande número de enzimas envolvidas torna complexa a análise do sistema quitinolítico em fungos. A caracterização funcional dos genes envolvidos, somados a aspectos de sua expressão, permitirá elucidar a participação das NAGases nos processos da biologia de *M. anisopliae* e identificar redundâncias e especificidades. Este capítulo traz os resultados preliminares da geração de mutantes nulos para estudo funcional dos genes de MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 de *M. anisopliae*.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material biológico

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

5.2.2. Meios de cultivo e manutenção dos organismos

Meios de Cultivo e Manipulação para *M. anisopliae*

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

Meios de Cultivo e Manipulação para *E. coli*

Inóculos de células de *E. coli* XL1-Blue ou TG2 foram efetuados em Meio Luria-Bertani (LB) [triptona 1 %, extrato de levedura 5 %, NaCl 1 % (p/v), pH 7,0] e em Meio SOC [triptona 1 %, extrato de levedura 5 %, NaCl 1 % e glicose 20 mM] após eletroporação. Aos meios sólidos foram adicionados 1,5 % de ágar. Todos foram mantidos a 37°C.

5.2.3. Construção de cassettes para deleção das NAGases

Para a construção dos *cassettes* de deleção dos genes de NAGases foram selecionadas regiões contendo 1.000 pb, localizadas nas regiões que flanqueiam as sequências codificantes para cada gene. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores

específicos para amplificar as regiões flangeadoras assim como para o *cassette* que expressa o gene *bar*. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na **Tabela 1**. Este gene codifica uma fosfotricina-acetiltransferase (THOMPSON et al., 1987) que confere resistência ao antibiótico glifosinato de amônio e permite, portanto, a seleção de transformantes de *M. anisopliae* em meio contendo este antibiótico (250 µg/mL) (**Figura 9**). A partir de uma PCR de sobreposição estes três fragmentos são fusionados (YU et al., 2004). O fragmento fusionado foi primeiramente clonado em pCR2.1-TOPO, propagado e após subclonado em pPZP201BK. As clonagens foram confirmadas por clivagens com enzimas de restrição e PCR. Os vetores confirmados pPZP::ΔMaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 foram transformados em *A. tumefaciens* EHA105.

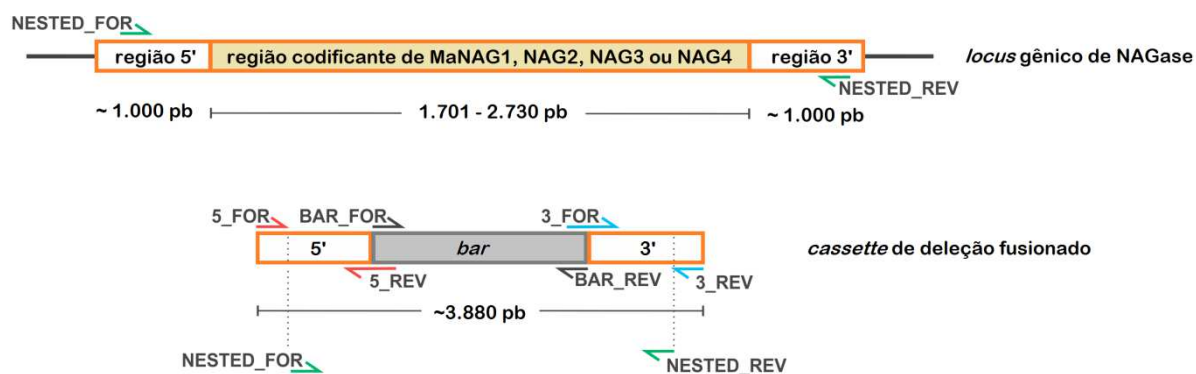


Figura 9. Representação esquemática da construção dos cassetes para deleção dos genes de NAGases em *M. anisopliae*. As regiões 5' e 3' contendo 1.000 pb de cada gene de NAGase (em laranja), foram amplificadas com pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene (destacados em vermelho e em azul). O gene que confere resistência a glifosinato de amônio (*bar*, em cinza), foi amplificado com par de oligonucleotídeos BAR_FOR e BAR_REV (preto), e fusionado às regiões 5' e 3' por PCR de fusão (*primers* NESTED, em verde). As setas indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para construção e confirmação do *cassete*.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores de deleção dos genes de NAGases de *M. anisopliae*.

Identificação	Sequência 5'-3'	Objetivo
MaNAG1_5_FOR	GACATCAATTGATCAATGAT	Amplifica a região 5' do gene <i>MaNAG1</i>
MaNAG1_5_REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCCTGTACAGGTTGAGACGAGATTTGCCAA	
MaNAG1_3_FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCGCGAGATGGACTTGAGCTTT	Amplifica a região 3' do gene <i>MaNAG1</i>
MaNAG1_3_REV	GGCTTCAATGTTCCATCCAC	
MaNAG1_NESTED_FOR	TATGACCATGATTACGTCGAGGTGCCTGATTGATA	Amplifica o cassette de deleção do gene <i>MaNAG1</i>
MaNAG1_NESTED_REV	CAGGTCGACTCTAGACCGGCCTGGAAGCCGTCATG	
MaNAG2_5_FOR	ATGCGGGGGCTATTCGACTG	Amplifica a região 5' do gene <i>MaNAG2</i>
MaNAG2_5_REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCCTGTACAGTGATGCTTCCCAGGTTGAAC	
MaNAG2_3_FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTGTTACAGGCCCGCCGCGA	Amplifica a região 3' do gene <i>MaNAG2</i>
MaNAG2_3_REV	GCCCTGTTCTGCTCCAGAAT	
MaNAG2_NESTED_FOR	TATGACCATGATTACAGTCAAAATAGCACTGAGCC	Amplifica o cassette de deleção do gene <i>MaNAG2</i>
MaNAG2_NESTED_REV	CAGGTCGACTCTAGATGAAAACCAAGCGCCCCGACAT	
MaNAG3_5_FOR	CAGCCGGCAAGCACCACAAG	Amplifica a região 5' do gene <i>MaNAG3</i>
MaNAG3_5_REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCCTGTACAGGGTGAATGGGACGGGGACGG	
MaNAG3_3_FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCGCGACAGCATTGAACAGAAC	Amplifica a região 3' do gene <i>MaNAG3</i>
MaNAG3_3_REV	AGTAAACTGACTGCGTGACC	
MaNAG3_NESTED_FOR	TATGACCATGATTACCCTAGGTACCAGGCTGCATG	Amplifica o cassette de deleção do gene <i>MaNAG3</i>
MaNAG3_NESTED_REV	CAGGTCGACTCTAGAAGACACAGAGGAGCTGAGCA	

MaNAG4_5_FOR	CTTGTCCTCGCCGATGAGCC	Amplifica a região 5' do gene <i>MaNAG4</i>
MaNAG4_5_REV	TGCCAGAAAGAGTCACCGGTCACGTGTACAGTGTTCCCTGCTTCGTCGTTTC	
MaNAG4_3_FOR	TGTACTTTGACATGCTCCTCTTCTTTACTCTATGTGTAGGGAATGATCAA	Amplifica a região 3' do gene <i>MaNAG4</i>
MaNAG4_3_REV	TGATGCGGCGGTATCCAGGG	
MaNAG4_NESTED_FOR	GAACCACGATGGGTAGATGA	Amplifica o cassette de deleção do gene <i>MaNAG4</i>
MaNAG4_NESTED_REV	GTGCCGTCGCAATTATGTGT	
BAR_1880_FOR	CTGTACAGTGACCGGTGACT	Amplifica o cassette de expressão da marca de seleção (gene <i>bar</i>)
BAR_1880_REV	GAGTAAAGAAGAGGAGCATG	

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

As células de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores pPZP:: Δ MaNAG1, pPZP:: Δ MaNAG2, pPZP::MaNAG3e pPZP::MaNAG4 foram utilizadas para agrotransformação de *M. anisopliae* conforme protocolo previamente estabelecido (STAATS et al., 2007). Brevemente, células de *A. tumefaciens* portando o vetor recombinante foram co-cultivadas com esporos *M. anisopliae* para permitir a transferência do material inserido entre as bordas esquerda e direita do vetor. É utilizada acetoseringona para permitir a indução dos genes de virulência da bactéria. Foram feitas 30 placas para cada agrotransformação e, a partir dessas placas, as colônias fúngicas transformantes que foram capazes de atravessar a camada de top ágar contendo glifosinato de amônio foram recuperadas e isoladas. As linhagens transformantes se caracterizam pela inserção: do *cassette* de deleção das NAGases e do *cassette* de expressão do gene de resistência a glifosinato de amônio (gene *bar*).

5.2.5. Busca por mutantes nulos dentre as colônias transformantes

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

contendo ~200 pb e contida somente no *locus* selvagem, portanto, um resultado negativo é esperado para os possíveis transformantes positivos. Essa reação, utilizando os mesmos *primers* descritos no Capítulo I (**Table S1**), e foi repetida três vezes para confirmar a ausência de produtos de amplificação. Posteriormente, as colônias transformantes que apresentarem resultado negativo são inoculadas em meio líquido para cultivo de micélio fúngico e extração de DNA. Em uma segunda análise por PCR, o oligonucleotídeo senso anela no *locus* genômico do gene estudado e o oligonucleotídeo antissenso anela em uma região presente exclusivamente no *cassette* de deleção construído. Os oligonucleotídeos utilizados nessas reações estão listados na **Tabela 1**. Os produtos de amplificação resultantes fornecem informação a respeito da inserção homóloga ou ectópica dos *cassettes* construídos.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Construção de vetores para produzir mutantes nulos para os genes de NAGases

As regiões 5' e 3' de cada um dos quatro genes de NAGase MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 de *M. anisopliae* foram fusionadas ao *cassette* de expressão da marca de resistência utilizando-se uma reação de fusão por PCR. Em um primeiro momento, as quatro diferentes fusões foram clonadas no vetor pCR2.1TOPO, dando origem aos plasmídeos pCR21:: Δ MaNAG1, pCR21:: Δ MaNAG2, pCR21:: Δ MaNAG3 e pCR21:: Δ MaNAG4. Após confirmações, os quatro os *cassettes* de deleção para os genes de NAGases foram clonados em pPZP201BK para obtenção dos vetores de agrotransformação pPZP:: Δ MaNAG1, pPZP:: Δ MaNAG2, pPZP:: Δ MaNAG3 e

pPZP:: Δ MaNAG4. As construções foram confirmadas por reações de PCR (**Figura 10**) e por digestão com enzimas de restrição (**Figura 11**).

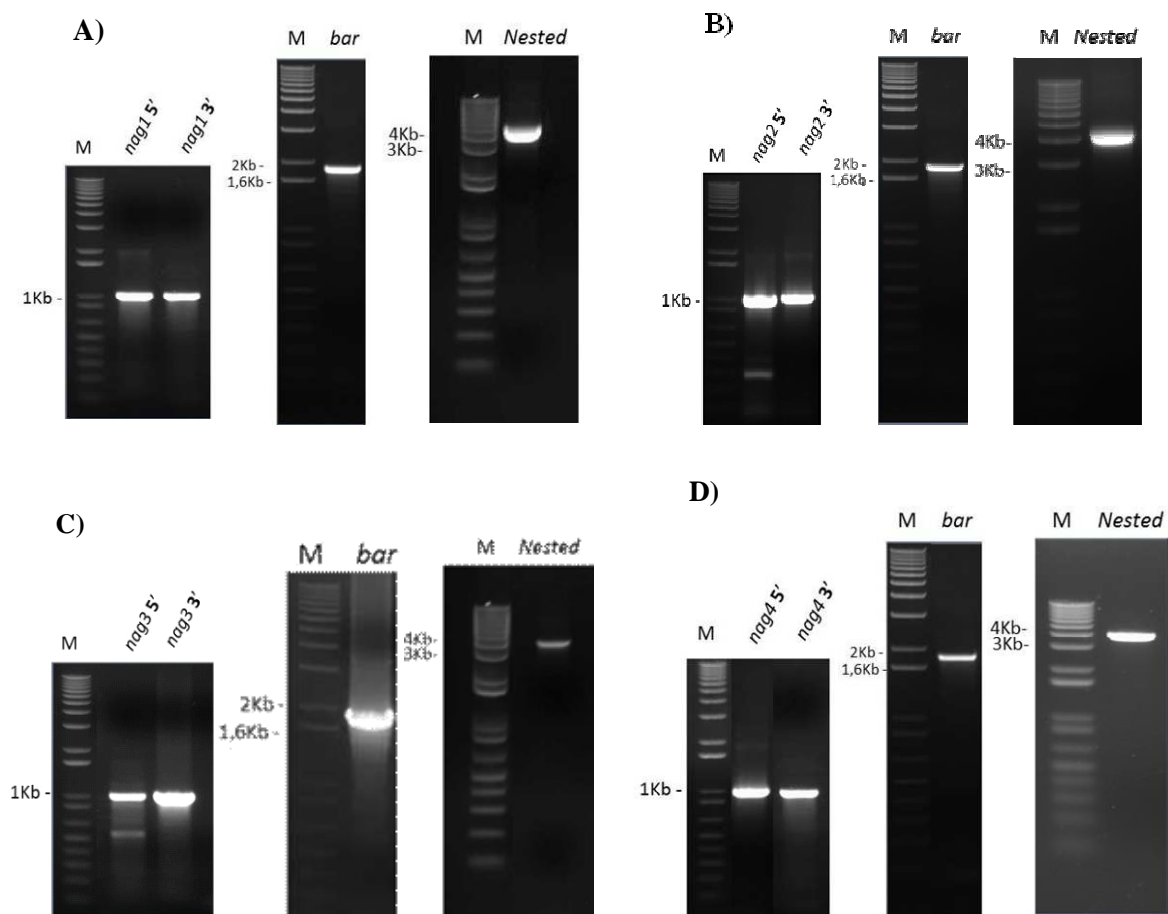
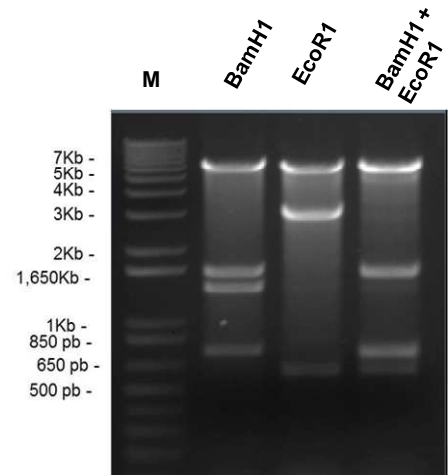
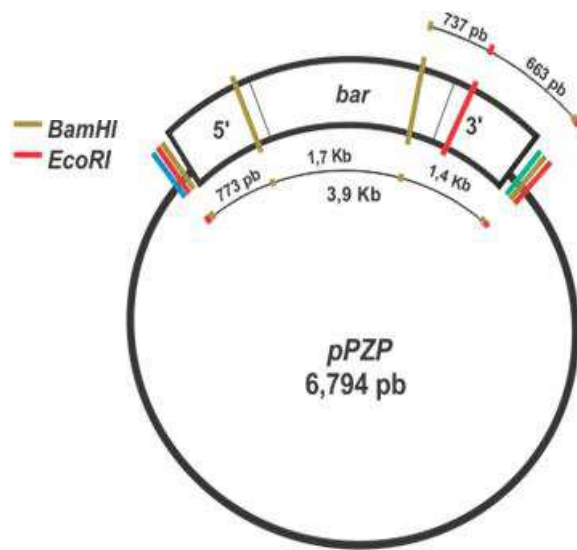
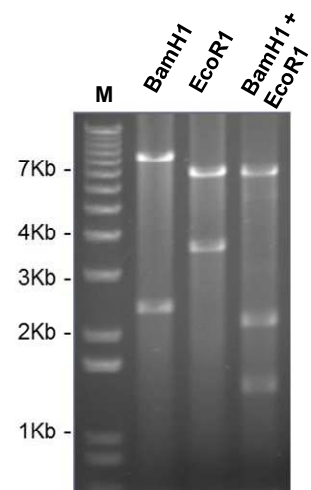
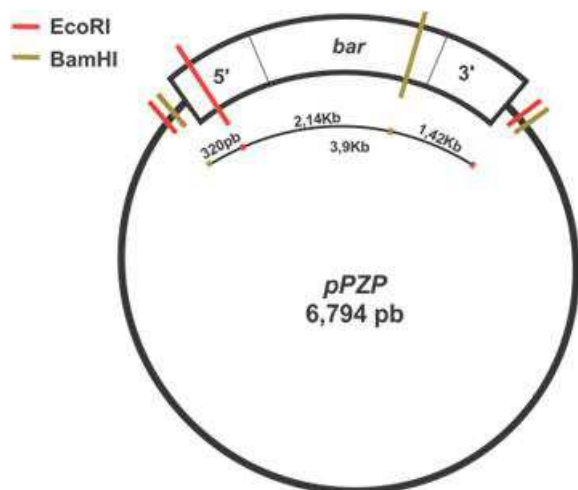


Figura 10. Confirmação da construção dos cassettes de deleção Δ MaNAG1, Δ MaNAG2, Δ MaNAG3 e Δ MaNAG4. Confirmação da construção dos cassettes de deleção por reações de PCR. As regiões 5'e 3' de cada gene foram fusionadas com o cassette para expressão do gene que confere resistência a glifosinato de amônio (indicado como *bar*). M- marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder, *Nested* – reação de amplificação do cassette fusionado.

A)



B)



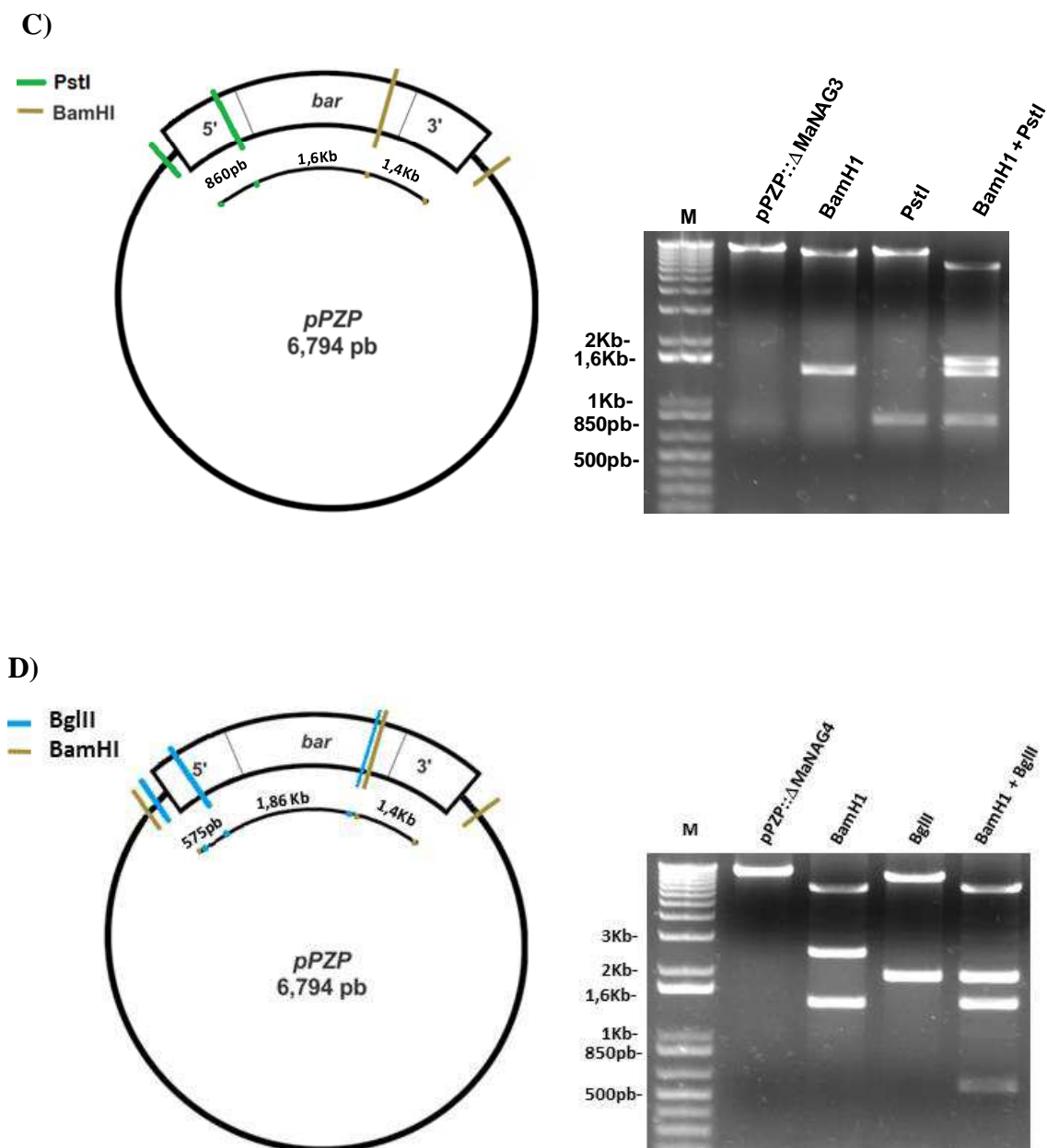


Figura 11. Confirmação da construção dos vetores pPZP:: Δ NAG1, pPZP:: Δ NAG2, pPZP:: Δ NAG3 e pPZP:: Δ NAG4. Confirmação da construção dos *cassettes* de deleção por digestão com enzimas de restrição. Representação esquemática dos vetores pPZP:: Δ MaNAG1 e pPZP:: Δ MaNAG2 pPZP:: Δ MaNAG3 e pPZP:: Δ MaNAG4. As regiões 5' e 3' de cada gene estão fusionadas com o *cassete* para expressão do gene que confere resistência a glifosinato de amônio (indicado como *bar*). As enzimas de restrição destacadas foram utilizadas para confirmação da construção dos vetores. A digestão dos vetores pPZP:: Δ MaNAG1 e pPZP:: Δ MaNAG2 foi realizada com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* (A e B). A digestão do vetor pPZP:: Δ MaNAG3 foi realizada com as enzimas de restrição *BamHI* e *PstI* (C). A digestão do vetor pPZP:: Δ MaNAG4 foi realizada com as enzimas de restrição *BamHI* e *BglII* (D). pPZP201BK (6.794 pb). M- marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder.

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

Entre 200 a 300 colônias fúngicas foram recuperadas a partir de cada experimento de agrotransformação. O número de transformantes recuperados foi de 295 para $\Delta MaNAG1$, 280 para $\Delta MaNAG2$, 272 para $\Delta MaNAG3$ e para 230 $\Delta MaNAG4$. As colônias se desenvolveram em meio mínimo contendo glifosinato de amônia (250 $\mu\text{g/mL}$) e foram mantidas nesta mesma condição por repiques sucessivos. A grande maioria das colônias recuperadas apresentou fenótipo semelhante ao observado no tipo selvagem, mas algumas colônias apresentaram desenvolvimento micelial reduzido.

5.3.3. *Identificação de mutantes nulos nas colônias transformantes*

A detecção de mutantes nulos dentre os transformantes recuperados de cada ATMT, resultantes de eventos de recombinação homóloga, foi realizada através de PCRs consecutivas. Em uma primeira reação, utilizando-se *primers* específicos para região interna do gene alvo, verificou-se a sua amplificação. Como nessa primeira reação de PCR o resultado esperado é negativo, somente os transformantes que não produziram produtos de PCR foram selecionados para a próxima etapa. Na **Figura 12**, pode-se observar exemplos dos produtos de amplificação obtidos utilizando-se essa metodologia. Das 295 colônias transformantes obtidas para $\Delta MaNAG1$, 18 exibiram o padrão negativo esperado. A ausência de produtos de amplificação também foi observada para 15 dos 280 transformantes $\Delta MaNAG2$, 12 dos 272 transformantes $\Delta MaNAG3$ e apenas 6 transformantes $\Delta MaNAG4$ apresentaram o padrão negativo após reações (**Tabela 2**). O padrão negativo foi repetido três vezes utilizando como molde DNA de uma extração independente a cada vez.

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

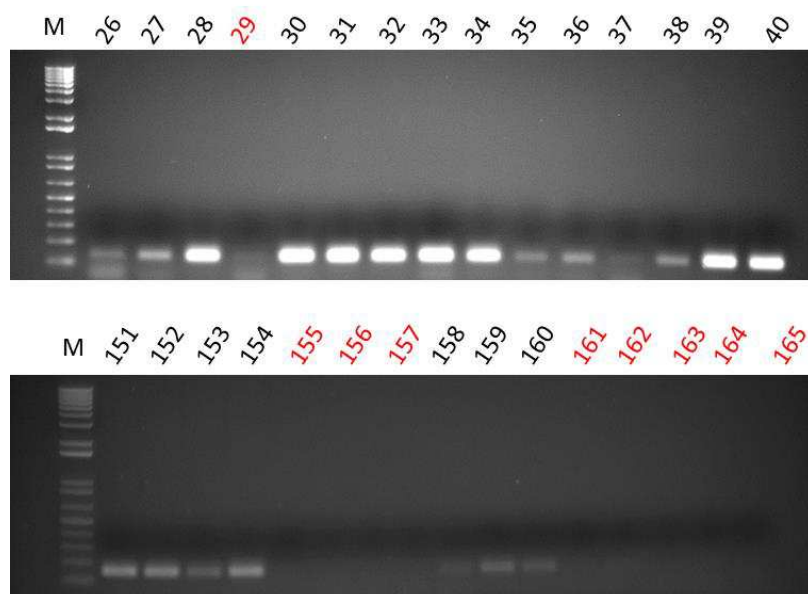


Figura 12. Primeira etapa da detecção de mutantes para os genes MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4. Utilizando reações de PCR, todos os transformantes de cada agrotransformação foram analisados para encontrar mutantes nulos. Números destacados em vermelho representam os isolados com amplificação negativa da região interna do gene selvagem. Produtos de amplificação esperados possuem ~200 pb.

Tabela 2. Número de potenciais mutantes nulos de *M. anisopliae* E6 dentre os transformantes obtidos por ATMT.

Construção	Número de transformantes obtidos	Número de mutantes nulos	Frequência (%)
Δ MaNAG1	295	18	6.10
Δ MaNAG2	280	15	5.36
Δ MaNAG3	272	12	4.41
Δ MaNAG4	235	6	2.55

5.4. DISCUSSÃO

A transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT), se tornou uma técnica comum para o estudo de uma ampla variedade de espécies fúngicas nos últimos 15 anos. A técnica tem sido aplicada com sucesso em mais de 125 espécies de fungos diferentes, incluindo membros dos ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos, oomicetos e glomeromicetos. O protocolo de ATMT desenvolvido pelo nosso grupo (STAATS et al., 2007) foi utilizado para transformar *M. anisopliae* com vetores de deleção para genes das quitinases *ChiMaB1* e *ChiMaB2* (BOLDO et al., 2009; STAATS et al., 2013). Diversos estudos em espécies de *Metarhizium* utilizaram a ATMT com sucesso, como, por exemplo, em *M. robertsii* (DONZELLI et al., 2012), *M. anisopliae* ARSEF2575 (MOON et al., 2008), *M. anisopliae* BCRC35505 (TSENG; CHUNG; TZEAN, 2011) e *M. brunneum* (SEVIM et al., 2012).

Para a construção de mutantes nulos, não se pode levar em consideração somente a capacidade de transformação, mas é de fundamental importância obter elevada frequência de recombinação homóloga. A introdução do T-DNA dentro das células fúngicas pode ter diferentes resultados, incluindo a degradação parcial ou total do T-DNA, replicação autossômica do T-DNA ou integração do T-DNA no genoma (VAN ATTIKUM; BUNDOCK; HOOYKAAS, 2001). A integração depende de duas vias de reparo de DNA, a união terminal não-homóloga (*non-homologous endjoining* – NHEJ) e a recombinação homóloga. O objetivo principal da construção de mutantes nulos é a integração do *cassette* de deleção no *locus* selvagem do gene alvo, resultado da recombinação homóloga, entretanto, nem sempre a frequência desse evento é elevada. Os estudos de ATMT em fungos apresentam, em sua maioria, baixas frequências de inserção por recombinação

homóloga, como de 0,04% em *Blastomyces dermatitidis*, e somente poucos estudos apresentaram frequências próximas aos obtidos em *S. cerevisiae*, as mais altas sendo 78% em *Fusarium graminearum* e 76% em *F. oxysporum* (FRANDBSEN, 2011).

A baixa frequência de recombinação homóloga em muitas espécies fúngicas tem sido foco de estudo sobre os fatores que afetam a eficiência em experimentos de ATMT. A solução mais significativa para solucionar este problema é a geração de linhagens mutantes com defeitos na via de recombinação não-homóloga NHEJ (mutantes *Ku70*, *Ku80* ou *lig4*). Mutações na via NHEJ forçam a integração genômica do T-DNA via sistema de recombinação homóloga (VAN ATTIKUM; BUNDOCK; HOOYKAAS, 2001). A deleção de *Ku* já foi realizada em mais de 20 espécies de fungos filamentosos, resultando sempre em um aumento na frequência de recombinação homóloga, mostrando-se uma estratégia eficiente para a geração de mutantes para estudos funcionais. No entanto, este aumento na taxa de recombinação homóloga depende da espécie e do gene alvo, promovendo variações nos resultados obtidos entre as espécies de fungos filamentosos estudadas (KÜCK; HOFF, 2010). A deleção do gene *Ku70* em *M. robertsii* aumentou drasticamente a eficiência de disrupção por recombinação homóloga. A frequência de disrupção do gene associado à conidiação *Cag8* em uma linhagem $\Delta ku70$ foi de 93% comparado a 3% na linhagem selvagem. Ainda, a linhagem $\Delta ku70$ de *M. robertsii* não apresentou diferenças no seu desenvolvimento, patogenicidade e tolerância a diversos estressores abióticos (XU et al., 2014).

Nosso grupo está atualmente trabalhando na obtenção desta linhagem de *M. anisopliae* $\Delta ku70$. Resultados preliminares indicam que a taxa de disrupção do gene da quitinase *chimaD1* aumentou de 1% na linhagem selvagem para aproximadamente 40% na linhagem $\Delta ku70$. A linhagem $\Delta Ku70$ não apresentou diferenças fenotípicas comparadas à

linhagem selvagem e não apresentou uma maior sensibilidade a estressores abióticos (osmóticos, oxidativos e de parede celular), possuindo taxa de crescimento similar à da linhagem selvagem de *M. anisopliae*. Ainda, a linhagem Δ Ku70 de *M. anisopliae* não reduziu sua capacidade de infecção em *Ulomoides dermestoides* (CZECZOT, 2016). Visto que, a linhagem Δ Ku70 não difere da linhagem selvagem quanto ao seu desenvolvimento, tolerância a estressores abióticos e patogenicidade, apresentando significativo aumento da frequência de disrupção gênica, ela poderá ser utilizada nos projetos de caracterização funcional de um amplo espectro de genes envolvidos nos processos biológicos de *M. anisopliae*.

De qualquer maneira, mesmo considerando-se a natural baixa frequência de recombinação homóloga, o número de mutantes nulos Δ MaNAG1, Δ MaNAG2, Δ MaNAG3 e Δ MaNAG4 poderia ter sido relativamente maior. É possível que algum fenótipo resultante da deleção dos genes das NAGases possa ter sido determinante para a baixa frequência de recombinação homóloga obtida em nossos experimentos. Essa hipótese deve-se à possibilidade de que os mutantes nulos para os genes das NAGases apresentem desenvolvimento tardio em relação aos transformantes com inserção ectópica. Dessa forma, é possível que os mutantes nulos tenham sido preteridos no momento do isolamento das colônias transformantes das placas de ATMT.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu com a área de estudo por constatar a participação de NAGases na biologia de *M. anisopliae*, por meio da identificação de genes membros das famílias GH20 e GH3 e da investigação de seus papéis em processos que envolvem o metabolismo de quitina. Assim, destacam-se as principais conclusões:

- *M. anisopliae* possui quatro genes putativos que codificam para NAGases. As NAGases MaNAG1 e MaNAG2 pertencem à família GH20 e são ortólogas a NAGases já caracterizadas em outros ascomicetos. As NAGases MaNAG3 e MaNAG4 pertencem à família GH3 e são ortólogas a NAGases bacterianas;
- MaNAG2 apresenta um espectro mais amplo de ortólogos em ascomicetos com diferentes estilos de vida – entomopatógenos, micoparasitas, fitopatógenos, patógenos humanos, saprófitos – enquanto MaNAG1 possui ortólogos majoritariamente em outros fungos entomopatógenos. A presença disseminada de ortólogos de MaNAG2 pode representar uma função básica comum a fungos, independentemente de seu estilo de vida, enquanto MaNAG1 pode ter uma função mais específica na entomopatogenicidade;
- Considerando-se a presença de ortólogos em ascomicetos com diferentes estilos de vida, a análise filogenética das NAGases da família GH3 sugere que estas NAGases não desempenham função específica na entomopatogenicidade, mas possivelmente estão envolvidas em processos celulares basais como, por exemplo, o metabolismo de GlcNAc e o remodelamento da parede celular necessário para o crescimento hifal e diferenciação celular;

- Os quatro genes de NAGases de *M. anisopliae* E6 não apresentaram um padrão de indução ou repressão de sua expressão em resposta a diferentes condições, indicando a não existência de um padrão comum de regulação. Estes perfis de expressão distintos também sugerem que eles não devem possuir funções totalmente redundantes;
- As NAGases da família GH20 possuem um padrão similar de indução de expressão em quitina 1%, ainda que em MaNAG1 esta indução tenha sido mais acentuada do que em MaNAG2. Isto indica que estas duas enzimas podem apresentar atividade quitinolítica redundante ou complementar;
- A presença de peptídio sinal para a secreção nas NAGases da família GH20, MaNAG1 e MaNAG2, somada a prévia identificação de atividade de NAGase em sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae*, sugere que estas enzimas atuam na clivagem de quitina exógena no meio extracelular;
- MaNAG2 foi a NAGase com maior nível de indução de expressão em apressório, sugerindo que esta NAGase seria mais necessária durante os primeiros estágios de infecção: remodelamento da parede celular na diferenciação em apressório ou durante o estágio de penetração do hospedeiro;
- MaNAG3 foi a única NAGase que teve sua expressão induzida por GlcNAc 0,25% e não foi induzida por quitina 1%. Esses resultados sugerem um mecanismo de regulação da expressão de MaNAG3 no qual a sua indução depende que, primeiramente, ocorra a completa degradação de quitina a monômeros de GlcNAc, resultante da atividade de alguma outra NAGase do fungo;
- As NAGases da família GH3 apresentaram níveis de expressão relativa mais elevados em condição de autólise induzida. Este dado reforça as evidências da

participação destas NAGases em processos não diretamente relacionados à infecção;

- A identificação dos genes MaNAG3 e MaNAG4 é a primeira evidência da presença de NAGases da família GH3 em fungos entomopatogênicos;
- A construção de mutantes para os genes das quatro NAGases foi confirmada em uma primeira etapa por PCR utilizando DNA extraídos de esporos;
- A frequência de potenciais transformantes nulos para os genes de MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 foi reduzida (6,1%, 5,4%, 4,4% e 2,6% respectivamente).

7. PERSPECTIVAS

Quanto às possibilidades futuras para complementação dos estudos abordados nessa tese, destacam-se:

- Ampliar a análise da regulação da expressão das NAGases de *M. anisopliae* frente a diferentes fontes de carbono;
- Concluir a construção dos mutantes funcionais por ATMT para as quatro NAGases, preferencialmente utilizando uma linhagem $\Delta ku70$ de *M. anisopliae*;
- Analisar funcionalmente as NAGases, estudando os mutantes para os genes MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4 em ensaios fenotípicos e bioensaios contra diferentes hospedeiros (*D. peruvianus* e *R. microplus*);
- Analisar o perfil de expressão de quitinases e NAGases frente à disrupção dos genes MaNAG1, MaNAG2, MaNAG3 e MaNAG4;
- Analisar as regiões promotoras das NAGases para buscar sítios de ligação a fatores de transcrição e inferir possível relação com as funções dos genes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. Pt 7, p. 2029–35, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256547>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- AGRAWAL, Y.; KHATRI, I.; SUBRAMANIAN, S.; SHENOY, B. D. Genome sequence, comparative analysis, and evolutionary insights into chitinases of entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 3, p. 916–30, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25716828>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- ALVAREZ, F. J.; KONOPKA, J. B. Identification of an N-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 3, p. 965–75, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192409>>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. [s.l.: s.n.]
- ARRUDA, W. R.; BECK, I. L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, n. 3-4, p. 231–244, 2005.
- BARATTO, C. M.; DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 11, p. 723–6, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735222>>. Acesso em: 18 fev. 2016.
- BARATTO, C. M.; DUTRA, V.; BOLDO, J. T.; LEIRIA, L. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 217–221, 27 set. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00284-006-0078-6>>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- BARNHART, M. M.; LYNEM, J.; CHAPMAN, M. R. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 14, p. 5212–9, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816193>>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and Effect of N-Acetylglucosamine in Protein Secretion. **Current Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 102–107, 2004.
- BASSET, Y.; CIZEK, L.; CUÉNOUD, P.; DIDHAM, R. K.; et al. Arthropod diversity in a tropical forest. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6113, p. 1481–4, 14 dez. 2012.

- Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239740>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–60, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666245>>. Acesso em: 8 jul. 2016.
- BERNARD, M.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Medical mycology**, v. 39 Suppl 1, p. 9–17, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800273>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BERNHEIM, N. J.; DOBROGOSZ, W. J. Amino sugar sensitivity in *Escherichia coli* mutants unable to grow on N-acetylglucosamine. **Journal of bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 384–91, fev. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4905307>>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P. F.; SILVA, L. A. D.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11, p. 911–916, 2010.
- BHATTACHARYA, A.; BANERJEE, S.; DATTA, A. Regulation of N-acetylglucosamine kinase synthesis in yeast. **Biochimica et biophysica acta**, v. 374, n. 3, p. 384–91, 20 dez. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4373081>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BHATTACHARYA, A.; PURI, M.; DATTA, A. Induction of N-acetylglucosamine kinase in yeast. **The Biochemical journal**, v. 141, n. 2, p. 593–5, ago. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4375984>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. a; HUMBER, R. a. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.
- BISWAS, M.; SINGH, B.; DATTA, A. Induction of N-acetylmannosamine catabolic pathway in yeast. **Biochimica et biophysica acta**, v. 585, n. 4, p. 535–42, 18 jul. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/223651>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, 2011.
- BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO, H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current microbiology**, v. 37, n. 4, p. 221–5, out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732526>>. Acesso em: 7 jul. 2016.
- BOLDO, J. T.; AMARAL, K. B. do; JUNGES, A.; PINTO, P. M.; STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Evidence of alternative splicing of the *chi2* chitinase gene from *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 462, n. 1, p. 1–7, 2010.

- BOLDO, J. T.; JUNGES, A.; DO AMARAL, K. B.; STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 551–560, 1 out. 2009.
- BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K.; AUCOIN, D. P. Fungal pathogens - a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 142, p. 1-11, 2012.
- BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 2, p. 418, 2006.
- BRUNNER, K.; PETERBAUER, C. K.; MACH, R. L.; LORITO, M.; ZEILINGER, S.; KUBICEK, C. P. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, v. 43, n. 4, p. 289–295, 2003.
- BUSHLEY, K. E.; RAJA, R.; JAISWAL, P.; CUMBIE, J. S.; et al. The Genome of *Tolypocladium inflatum*: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 6, p. e1003496, 20 jun. 2013.
- CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 59, p. 59–101, 1987.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n.
- CASTILLA, R.; PASSERON, S.; CANTORE, M. L. N-Acetyl-d-Glucosamine Induces Germination in *Candida albicans* through a Mechanism Sensitive to Inhibitors of cAMP-Dependent Protein Kinase. **Cellular Signalling**, v. 10, n. 10, p. 713–719, 1998.
- CHARNLEY, A. K.; ST. LEGER, R. J. The Role of Cuticle-Degrading Enzymes in Fungal Pathogenesis in Insects. In: **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. Boston, MA: Springer US, 1991. p. 267–286.
- CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 4, p. 833–46, 2013.
- CHENG, Q.; LI, H.; MERDEK, K.; PARK, J. T. Molecular characterization of the beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4836–40, out. 2000.
- CHITLARU, E.; ROSEMAN, S. Molecular cloning and characterization of a novel beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii*. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33433–9, 27 dez. 1996.
- CHOI, K. H.; SEO, J. Y.; PARK, K. M.; PARK, C. S.; CHA, J. Characterization of glycosyl hydrolase family 3 β -N-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 455–459, 2009.
- CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal

- pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 197–203, maio 1996.
- CZECZOT, A. de M. Desenvolvimento de sistemas de análise da função gênica para fungos entomopatogênicos: construção de linhagem $\delta ku70$ em metarhizium anisopliae. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2016.
- DA SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; DA COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 382–392, abr. 2005.
- DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, 21 ago. 2006.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853–859, 1995.
- DE BEKKER, C.; OHM, R. A.; LORETO, R. G.; SEBASTIAN, A.; et al. Gene expression during zombie ant biting behavior reflects the complexity underlying fungal parasitic behavioral manipulation. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 620, 19 dez. 2015.
- DE LA PAZ GIMÉNEZ-PECCI, M.; BOGO, M. R.; SANTI, L.; MORAES, C. K. de; CORRÊA, C. T.; HENNING VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current microbiology**, v. 45, n. 5, p. 334–9, nov. 2002.
- DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–30, maio 2012.
- DENNIS, J. W.; NABI, I. R.; DEMETRIOU, M. Metabolism, cell surface organization, and disease. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1229–41, 24 dez. 2009.
- DÍEZ, B.; RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; DE LA FUENTE, J. L.; MORENO, M. Á.; BARREDO, J. L. The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding β -N-acetylglucosaminidase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, n. 2, p. 257–264, 2005.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; FERREIRA, J. M. G.; GARCIA JR., C. A.; COELHO, Á. L.; GIL, M. A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 743–749, dez. 2004.
- DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; MOON, Y.-S.; SUN-MOON, Y.; CHURCHILL, A. C. L.; GIBSON, D. M. Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. **Current genetics**, v. 58, n. 2, p. 105–16, abr. 2012.
- DRABORG, H.; KAUPPINEN, S.; DALBØGE, H.; CHRISTGAU, S. Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*.

- Biochemistry and molecular biology international**, v. 36, n. 4, p. 781–91, jul. 1995.
- DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345–60, jun. 2006.
- EMRI, T.; MOLNÁR, Z.; SZILÁGYI, M.; PÓCSI, I. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 211–20, dez. 2008.
- FARIA, M. R. de; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.
- FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.
- FERREIRA, A. V. B.; GLASS, N. L. PCR from fungal spores after microwave treatment. **Fungal Genetic News**, v. 43, p. 25-26, 1996.
- FRANSEN, R. J. N. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 3, p. 247–262, 2011.
- FRAZZON, A. P. G.; VAZ JUNIOR, I. da S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 117–125, 2000.
- FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, 2005.
- GAO, Q.; JIN, K.; YING, S. H.; ZHANG, Y.; et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 1, p. e1001264, 2011.
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 1, p. 26–34, jan. 2012.
- GUNASEKERA, A.; ALVAREZ, F. J.; DOUGLAS, L. M.; WANG, H. X.; ROSEBROCK, A. P.; KONOPKA, J. B. Identification of GIG1, a GlcNAc-induced gene in *Candida albicans* needed for normal sensitivity to the chitin synthase inhibitor nikkomycin Z. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 10, p. 1476–83, out. 2010.
- HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1017–22, 26 abr. 2007.
- HART, G. W.; SLAWSON, C.; RAMIREZ-CORREA, G.; LAGERLOF, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 825–58, 2011.
- HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: Diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**,

- v. 93, n. 2, p. 533–543, 2012.
- HORSCH, M.; MAYER, C.; SENNHAUSER, U.; RAST, D. M. β -N-acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, n. 1-3, p. 187–218, 1997.
- HOWARD, M. B.; EKBORG, N. A.; WEINER, R. M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627–35, nov. 2003.
- HU, X.; XIAO, G.; ZHENG, P.; SHANG, Y.; SU, Y.; ZHANG, X.; LIU, X.; ZHAN, S.; ST LEGER, R. J.; WANG, C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 47, p. 16796–801, 25 nov. 2014.
- HURTADO-GUERRERO, R.; DORFMUELLER, H. C.; VAN AALTEN, D. M. Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 5, p. 551–557, 2008.
- JUNGES, A. **As quitinases de metarhizium anisopliae: caracterização genômica e funcional**. (Tese) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.
- JUNGES, Â.; BOLDO, J. T.; SOUZA, B. K.; GUEDES, R. L. M.; et al. Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107864, jan. 2014.
- KAMERERWERD, J.; ZADRA, I.; KÜRNSTEINER, H.; KÜCK, U. PchB1, encoding a class V chitinase, is affected by PcVelA and PcLaeA, and is responsible for cell wall integrity in *Penicillium chrysogenum*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 157, n. Pt 11, p. 3036–48, nov. 2011.
- KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811–29, 2014.
- KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. The Chitin Catabolic Cascade in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33425–33432, 1996.
- KIM, S.; MATSUO, I.; AJISAKA, K.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Cloning and characterization of the nagA gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 10, p. 2168–2175, 2002.
- KONOPKA, J. B. N-acetylglucosamine (GlcNAc) functions in cell signaling. **Scientifica**, v. 2012, p. 631–632, 2012.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current microbiology**, v. 46, n. 3, p. 205–10, mar. 2003.
- KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MARTINEZ, D.

- A.; et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. **Genome Biology**, v. 12, p. R40, 2011.
- KÜCK, U.; HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 51–62, mar. 2010.
- LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n. 1, p. 108–118, jul. 1988.
- LAN, X.; ZHANG, X.; KODAIRA, R.; ZHOU, Z.; SHIMOSAKA, M. Gene cloning, expression, and characterization of a second β -N-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 492–498, 2008.
- LATGÉ, J.-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279–90, out. 2007.
- LEAKE, J. R.; READ, D. J. Chitin as a nitrogen source for mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 94, n. 7, p. 993–995, out. 1990.
- LEBERER, E.; HARCUS, D.; DIGNARD, D.; JOHNSON, L.; USHINSKY, S.; THOMAS, D. Y.; SCHRÖPPEL, K. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 3, p. 673–87, nov. 2001.
- LEGER, R. J. S.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 2, p. 168–179, 1991.
- LEGER, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 3, p. 907–12, mar. 1996.
- LI, H.; MORIMOTO, K.; KATAGIRI, N.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; LUN, S.; OHMIYA, K. A novel β -N-acetylglucosaminidase of *Clostridium paraputrificum* M-21 with high activity on chitobiose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 420–427, 2002.
- LI, J.; FENG, M.-G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 93–99, jan. 2009.
- LISBOA DE MARCO, J.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N -acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 70–75, 1 mar. 2004.
- LIU, T.; YAN, J.; YANG, Q. Comparative Biochemistry of GH3, GH20 and GH84 β -N-acetyl-Dhexosaminidases and Recent Progress in Selective Inhibitor Discovery. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 4, p. 512–525, 2012.
- LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.;

- HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D490–5, jan. 2014.
- LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; CATALANO, V.; KUBICEK, C. P.; SEIDL, V. The β -N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. **FEBS Journal**, v. 276, n. 18, p. 5137–5148, 2009.
- LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 1, p. 19–29, 2005.
- LORITO, M.; HARMAN, E. G.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; DIPIETRO, A. Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 302–307, 1993.
- LOUREIRO, E. S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; MENDES, J. M.; PESSOA, L. G. A. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 47–53, mar. 2012.
- LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B. K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, n. 2-3, p. 78–88, maio 2008.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839–846, nov. 1998.
- MACAULEY, M. S.; STUBBS, K. A.; VOCADLO, D. J. O-GlcNAcase catalyzes cleavage of thioglycosides without general acid catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 49, p. 17202–3, 14 dez. 2005.
- MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; PAYER, K.; JAKSITS, S.; WOO, S. L.; ZEILINGER, S.; KULLNIG, C. M.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1858–1863, 1999.
- MAMARABADI, M.; JENSEN, D. F.; LÜBECK, M. An N-acetyl- β -d-glucosaminidase gene, *cr-nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 33–43, 2009.
- MARTINEZ-FLEITES, C.; KORCZYNSKA, J. E.; DAVIES, G. J.; COPE, M. J.; TURKENBURG, J. P.; TAYLOR, E. J. The crystal structure of a family GH25 lysozyme from *Bacillus anthracis* implies a neighboring-group catalytic mechanism with retention of anomeric configuration. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 13, p. 1753–1757, 2009.
- MAYER, C.; VOCADLO, D. J.; MAH, M.; RUPITZ, K.; STOLL, D.; WARREN, R. a J.;

- WITHERS, S. G. Characterization of a beta-N-acetylhexosaminidase and a beta-N-acetylglucosaminidase/beta-glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **The FEBS journal**, v. 273, n. 13, p. 2929–2941, 2006.
- MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759–769, 2011.
- MOON, Y.-S.; DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B.; MCLANE, H.; GRIGGS, M. H.; COOKE, P.; VANDENBERG, J. D.; GIBSON, D. M.; CHURCHILL, A. C. L. Agrobacterium-Mediated Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase Gene in the Invertebrate Pathogen *Metarhizium anisopliae* Reveals a Peptide Spore Factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4366–4380, 15 jul. 2008.
- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.
- MUZZARELLI, R. A. Native, industrial and fossil chitins. **EXS**, v. 87, p. 1–6, 1999.
- NADERER, T.; HENG, J.; MCCONVILLE, M. J. Evidence That Intracellular Stages of *Leishmania major* Utilize Amino Sugars as a Major Carbon Source. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 12, p. e1001245, 23 dez. 2010.
- NASEEM, S.; GUNASEKERA, A.; ARAYA, E.; KONOPKA, J. B. N-acetylglucosamine (GlcNAc) induction of hyphal morphogenesis and transcriptional responses in *Candida albicans* are not dependent on its metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 33, p. 28671–80, 19 ago. 2011.
- NASEEM, S.; PARRINO, S. M.; BUENTEN, D. M.; KONOPKA, J. B. Novel roles for GlcNAc in cell signaling. **Communicative & integrative biology**, v. 5, n. 2, p. 156–9, 1 mar. 2012.
- OGAWA, M.; KITAGAWA, M.; TANAKA, H.; UEDA, K.; WATSUJI, T.; BEPPU, T.; KONDO, A.; KAWACHI, R.; OKU, T.; NISHIO, T. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene cloning, overexpression, purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3, p. 457–464, 2006.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 239–249, 12 ago. 2015.
- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. **Chitinolytic enzymes: An exploration** **Enzyme and Microbial Technology**, 1 abr. 2000.
- PATTEMORE, J. A.; HANE, J. K.; WILLIAMS, A. H.; WILSON, B. A. L.; STODART, B. J.; ASH, G. J. The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. **BMC genomics**, v. 15, p. 660, 2014.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 124–137, jul. 2007.
- PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de

- metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal., 1854), em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Arq. Inst. Biol**, v. 75, n. 4, p. 465–469, 2008.
- PÉREZ-CAMPO, F. M.; DOMÍNGUEZ, A. Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. **Current microbiology**, v. 43, n. 6, p. 429–33, dez. 2001.
- PETERBAUER, C.; BRUNNER, K.; MACH, R.; KUBICEK, C. Identification of the N-acetyl-D-glucosamine-inducible element in the promoter of the *Trichoderma atroviride* *nag1* gene encoding N-acetyl-glucosaminidase. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 2, p. 162–170, 2002.
- PETERBAUER, C. K.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. **Current genetics**, v. 30, n. 4, p. 325–31, set. 1996.
- PÓCSI, I.; LEITER, E.; KWON, N.-J.; SHIN, K.-S.; KWON, G.-S.; PUSZTAHELYI, T.; EMRI, T.; ABUKNESHA, R. A.; PRICE, R. G.; YU, J.-H. Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 2, p. 514–23, ago. 2009.
- PUSZTAHELYI, T.; MOLNÁR, Z.; EMRI, T.; KLEMENT, É.; MISKEI, M.; KERÉKGYÁRTÓ, J.; BALLA, J.; PÓCSI, I. Comparative studies of differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 6, p. 547–554, 2006.
- PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Chitinase but N-acetyl- β -D-glucosaminidase production correlates to the biomass decline in *Penicillium* and *Aspergillus* species. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 61, n. 2, p. 131–43, jun. 2014.
- PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I.; KOZMA, J.; SZENTIRMAI, A. Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I: morphological changes and secondary metabolite production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 81–86, fev. 1997.
- RAMOT, O.; VITERBO, A.; FRIESEM, D.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. **Current Genetics**, v. 45, n. 4, p. 205–213, 2004.
- RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1355–1361, 2008.
- RAST, D. M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEIN, G. . Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 339–366, 2003.
- RAST, D. M.; HORSCH, M.; FURTER, R.; GOODAY, G. W. A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. **Journal of general microbiology**, v. 137, n. 12, p. 2797–810, dez. 1991.
- REEDY, J. L.; FLOYD, A. M.; HEITMAN, J. Mechanistic plasticity of sexual

- reproduction and meiosis in the *Candida* pathogenic species complex. **Current biology : CB**, v. 19, n. 11, p. 891–9, 9 jun. 2009.
- RIGALI, S.; NOTHAFT, H.; NOENS, E. E. E.; SCHLICHT, M.; COLSON, S.; MÜLLER, M.; JORIS, B.; KOERTEN, H. K.; HOPWOOD, D. A.; TITGEMEYER, F.; VAN WEZEL, G. P. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1237–51, set. 2006.
- RIGALI, S.; TITGEMEYER, F.; BARENDTS, S.; MULDER, S.; THOMAE, A. W.; HOPWOOD, D. A.; VAN WEZEL, G. P. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. **EMBO reports**, v. 9, n. 7, p. 670–5, jul. 2008.
- ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1–70, jan. 2004.
- RUIZ-HERRERA, J. **Fungal cell wall : structure, synthesis, and assembly**. [s.l.] CRC Press, 2012.
- SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 317–338, 1993.
- SÁMI, L.; PUSZTAHELYI, T.; EMRI, T.; VARECZA, Z.; FEKETE, A.; GRALLERT, A.; KARANYI, Z.; KISS, L.; PÓCSI, I. Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 47, n. 4, p. 201–211, ago. 2001.
- SANON, A.; TOURNAIRE-ARELLANO, C.; EL HAGE, S. Y.; BORIES, C.; CAUJOLLE, R.; LOISEAU, P. M. N-acetyl- β -d-hexosaminidase from *Trichomonas vaginalis*: substrate specificity and activity of inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 5, p. 245–248, 2005.
- SCHOLTE, E.-J.; KNOLS, B. G. J.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, n. 1, p. 43–49, 2006.
- SCHOLTE, E.-J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**, v. 102, n. 3, p. 151–158, 2007.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Metarhizium anisopliae enzymes and toxins** *Toxicon*, v. 56, p. 1267–1274, 2010.
- SCIGELOVA, M.; CROUT, D. H. G. Microbial beta-N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 3–14, 1999.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf.

- anisopliae Overexpressing Chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* Show Early Induction of Native Chitinase but Are Not Altered in Pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 260–266, nov. 2001.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, 2008.
- SEIDL, V.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (Trichoderma atroviride). **Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 2003–2012, 2006.
- SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS Journal**, v. 272, n. 22, p. 5923–5939, 2005.
- SEVIM, A.; DONZELLI, B. G. G.; WU, D.; DEMIRBAG, Z.; GIBSON, D. M.; TURGEON, B. G. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. **Current genetics**, v. 58, n. 2, p. 79–92, abr. 2012.
- SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 12, p. 1941–9, dez. 2006.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. M I N I -R E V I E W Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, p. 413–423, 2003.
- SHANG, Y.; FENG, P.; WANG, C. Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 8, p. e1005037, ago. 2015.
- SHIN, K.-S.; KWON, N.-J.; KIM, Y. H.; PARK, H.-S.; KWON, G.-S.; YU, J.-H. Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 5, p. 738–46, maio 2009.
- SIMONETTI, N.; STRIPPOLI, V.; CASSONE, A. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. **Nature**, v. 250, n. 464, p. 344–6, 26 jul. 1974.
- SINGH, B.; DATTA, A. Regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase synthesis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 583, n. 1, p. 28–35, fev. 1979a.
- SINGH, B.; DATTA, A. Induction of N-acetylglucosamine-catabolic pathway in spheroplasts of *Candida albicans*. **The Biochemical journal**, v. 178, n. 2, p. 427–31, 15 fev. 1979b.
- SINGH, B.; DATTA, A. Regulation of N-acetylglucosamine uptake in yeast. **Biochimica et biophysica acta**, v. 557, n. 1, p. 248–58, 19 out. 1979c.
- SLÁMOVÁ, K.; BOJAROVÁ, P.; PETRÁSKOVÁ, L.; KŘEN, V. B-N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...? **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 682–693, 2010.
- SOHANPAL, B. K.; EL-LABANY, S.; LAHOOTI, M.; PLUMBRIDGE, J. A.; BLOMFIELD, I. C. Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16322–7, 16 nov. 2004.
- 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, n. 1, p. 1–7, ago. 1994.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 3, p. 415–426, nov. 1991.
- STAATS, C. C. **Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico metarhizium anisopliae**. 2007. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular., 2007.
- STAATS, C. C.; JUNGES, A.; FITARELLI, M.; FURLANETO, M. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 945–50, set. 2007.
- STAATS, C. C.; JUNGES, A.; GUEDES, R. L. M.; THOMPSON, C. E.; et al. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. **BMC genomics**, v. 15, p. 822, jan. 2014.
- STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; LUBECK, I.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. **Fungal biology**, v. 117, n. 2, p. 137–44, fev. 2013.
- SUGINTA, W.; CHUENARK, D.; MIZUHARA, M.; FUKAMIZO, T.; et al. Novel β -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 40, 2010.
- SUH, S. O.; NODA, H.; BLACKWELL, M. Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 6, p. 995–1000, jun. 2001.
- SUMIDA, T.; ISHII, R.; YANAGISAWA, T.; YOKOYAMA, S.; ITO, M. Molecular cloning and crystal structural analysis of a novel β -N-acetylhexosaminidase from *Paenibacillus* sp. TS12 capable of degrading glycosphingolipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 1, p. 87–99, 2009.
- SUNG, G.-H.; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J.-M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J. W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in mycology**, v. 57, p. 5–59, 2007.
- SWIONTEK BRZEZINSKA, M.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71–81, jan. 2014.
- THOMPSON, C. J.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO journal**, v. 6, n. 9, p. 2519–

- 23, set. 1987.
- TOUNOU, A.-K.; KOOYMAN, C.; DOURO-KPINDOU, O.-K.; POEHLING, H.-M. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 203–210, 2008.
- TSENG, M. N.; CHUNG, P. C.; TZEAN, S. S. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4508–19, jul. 2011.
- TSUJIBO, H.; FUJIMOTO, K.; TANNO, H.; MIYAMOTO, K.; IMADA, C.; OKAMI, Y.; INAMORI, Y. Gene sequence, purification and characterization of N-acetyl-beta-glucosaminidase from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. **Gene**, v. 146, n. 1, p. 111–5, 19 ago. 1994.
- TSUJIBO, H.; HATANO, N.; MIKAMI, T. A Novel β -N-Acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 : Gene Cloning, Expression, and Assignment to Family 3 of the Glycosyl Hydrolases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2920–2924, 1998.
- TZELEPIS, G. D.; MELIN, P.; JENSEN, D. F.; STENLID, J.; KARLSSON, M. Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 49, n. 9, p. 717–30, set. 2012.
- VAN ATTIKUM, H.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. **The EMBO journal**, v. 20, n. 22, p. 6550–8, 15 nov. 2001.
- VOCADLO, D. J.; MAYER, C.; HE, S.; WITHERS, S. G. Mechanism of Action and Identification of Asp242 as the Catalytic Nucleophile of *Vibrio furnisii* N-Acetyl- β -d-glucosaminidase Using 2-Acetamido-2-deoxy-5-fluoro- α -l-idopyranosyl Fluoride \ddagger . 2000.
- VOCADLO, D. J.; WITHERS, S. G. Detailed comparative analysis of the catalytic mechanisms of beta-N-acetylglucosaminidases from families 3 and 20 of glycoside hydrolases. **Biochemistry**, v. 44, n. 38, p. 12809–18, 27 set. 2005.
- WANG, J. B.; ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. In: **Advances in genetics**, v. 94, p. 67–105, 2016.
- WESSELS, J. G. H. Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 413–437, 28 set. 1994.
- XIAO, G.; YING, S.-H.; ZHENG, P.; WANG, Z.-L.; ZHANG, S.; XIE, X.-Q.; SHANG, Y.; ST. LEGER, R. J.; ZHAO, G.-P.; WANG, C.; FENG, M.-G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, 2012.
- XU, C.; ZHANG, X.; QIAN, Y.; CHEN, X.; LIU, R.; ZENG, G.; ZHAO, H.; FANG, W. A high-throughput gene disruption methodology for the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107657, 2014.
- YAMADA-OKABE, T.; SAKAMORI, Y.; MIO, T.; YAMADA-OKABE, H.

- Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 8, p. 2498–505, abr. 2001.
- YANG, S.; SONG, S.; YAN, Q.; FU, X.; JIANG, Z.; YANG, X. Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5181–90, 2014.
- YU, J.-H.; HAMARI, Z.; HAN, K.-H.; SEO, J.-A.; REYES-DOMÍNGUEZ, Y.; SCAZZOCCHIO, C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 11, p. 973–981, 2004.
- YUZWA, S. A.; MACAULEY, M. S.; HEINONEN, J. E.; SHAN, X.; DENNIS, R. J.; HE, Y.; WHITWORTH, G. E.; STUBBS, K. A.; MCEACHERN, E. J.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 8, p. 483–90, ago. 2008.
- ZEIDAN, Q.; HART, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 1, p. 13–22, 1 jan. 2010.
- ZHENG, P.; XIA, Y.; XIAO, G.; XIONG, C.; HU, X.; ZHANG, S.; ZHENG, H.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, S.; ZHAO, G.-P.; LIU, X.; ST LEGER, R. J.; WANG, C. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, p. R116, 2011.
- ZHURAVLEVA, N. V.; LUK'IANOV, P. A.; PIVKIN, M. V. N-acetyl- β -D-hexosaminidase secreted by the marine fungus *Phoma glomerata*. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 40, n. 5, p. 520–6, 2004.

ANEXO I – *Curriculum Vitae*

DADOS PESSOAIS

Nome Eder Silva de Oliveira

Nascimento 23/10/1983 - Canoas/RS - Brasil

RG 1082458116 SJS - RS - 25/02/2005

CPF 003.598.700-66

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, lab. 220, B: Agronomia
91501-970, Porto Alegre/RS - Brasil

Telefone (51) 3308.7767

E-mail eder.oliveira@ufrgs.br; eder.oliveira@caxias.ifrs.edu.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2010 - Atual** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização genômica e funcional das b-N-acetilglicosaminidases de *Metarhizium anisopliae*
Orientador: Augusto Schrank
Co-orientador: Charley Christian Staats
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Identificação *in silico* de proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol nas espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans*,
Ano de obtenção: 2010
Orientador: Marilene Henning Vainstein
Co-orientador: Augusto Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado ênfase molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Influência da limitação de ferro na expressão de proteínas do fungo
Cryptococcus gattii

Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Sequenciamento de nova geração em doenças genéticas através da análise de painéis. (Carga horária: 12h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Qualificação em Imunizações - Enfermeiros multiplicadores. (Carga horária: 90h).
Escola de Saúde Pública do Rio Grande do Sul, ESP-RS, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Capacitação do Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva. (Carga horária: 40h).
Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, CEVS/RS, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Capacitação em Vigilância Epidemiológica Hospitalar. (Carga horária: 24h).
Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, CEVS/RS, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Identificação e controle de escorpiões de interesse em saúde. (Carga horária: 40h).
Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, CEVS/RS, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Oficina de atualização da vigilância das Meningites. (Carga horária: 8h).
Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, CEVS/RS, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações - SISPNI. (Carga horária: 16h).
Núcleo Estadual do Ministério da Saúde no Rio Grande do Sul, NEMS/RS, Porto Alegre, Brasil

- 2011 - 2011** Extensão universitária em Introdução à Microscopia Confocal de Fluorescência. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Genômica Funcional de Microrganismos Patogênicos. (Carga horária: 32h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2008** Extensão universitária em Projeto Educacional Alternativa Cidadã. (Carga horária: 500h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Introdução à Biologia Molecular Computacional. (Carga horária: 35h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em II Jornada acadêmica de Biologia. (Carga horária: 14h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em I Curso de Manipulação Genética. (Carga horária: 8h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Cursos de Férias - Atualização em Genética. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em Jornada Acadêmica de Biologia. (Carga horária: 12h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

- 2010 - Atual** Vínculo: Bolsista (até 2014), Enquadramento funcional: Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva (até 2014)
- 2009 - 2010** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado acadêmico, Regime: Dedicção exclusiva

2005 - 2009 Vínculo: Iniciação científica , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária semanal: 20 h, Regime: Dedicção exclusiva

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

2008 - 2009 Vínculo: Estágio curricular , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária semanal: 20 h, Regime: Parcial. Estágio Supervisionado, Laboratório de Micologia.

3. Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul – SES/RS

2015 - 2016 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Especialista em Saúde, Carga horária semanal: 40 h, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades Serviço Técnico Especializado, 5ª Coordenadoria Regional de Saúde - Caxias do Sul

Especificação: Coordenador do Grupo de Trabalho de Planejamento, Monitoramento e Análise da 5ª CRS , Coordenador Regional do Programa Estadual de Combate à Tuberculose , Responsável Técnico pela Divisão de Vigilância Epidemiológica , Responsável Técnico pelo Programa de Imunizações

4. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS/RS

2016 - Atual Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor EBTT, Carga horária semanal: 40 h, Regime: Dedicção exclusiva
Setembro/2016 – Abril/2017: lotação *Campus Canoas*
Abril/2017 – Atual: lotação *Campus Caxias do Sul*

Atividades Docente – área Biologia

Especificação: Docente de Biologia em cursos técnicos integrados ao ensino médio; Membro do Núcleo de Integração do Ensino, Pesquisa e Extensão (NIEPE) da área das Ciências Biológicas e da Saúde; Membro da Comissão de Avaliação e Gestão de Projetos de Pesquisa e Inovação (CAGPPI) - Representante da área de Ciências Biológicas e Saúde.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. STAATS, CHARLEY; JUNGES, ÂNGELA; GUEDES, RAFAEL LUCAS; THOMPSON, CLAUDIA; DE MORAIS, GUILHERME; BOLDO, JULIANO; DE ALMEIDA, LUIZ GONZAGA; ANDREIS, FÁBIO; GERBER, ALEXANDRA; SBARAINI, NICOLAU; DA PAIXÃO, RANA LOUISE DE ANDRADE; BROETTO, LEONARDO; LANDELL, MELISSA; SANTI, LUCÉLIA; BEYS-DA-SILVA, WALTER; SILVEIRA, CAROLINA; SERRANO, THAIANE; **DE OLIVEIRA, EDER**; KMETZSCH, LÍVIA; VAINSTEIN, MARILENE; DE VASCONCELOS, ANA TEREZA; SCHRANK, AUGUSTO. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics*, v.15, p.822 - , 2014.

2. BUSSAMARA, ROBERTA; FUENTEFRIA, ALEXANDRE MENEGHELLO; **OLIVEIRA, EDER SILVA DE**; BROETTO, LEONARDO; SIMCIKOVA, MICHAELA; VALENTE, PATRÍCIA; SCHRANK, AUGUSTO; [VAINSTEIN, MARILENE HENNING](#). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.101, p.268 - 275, 2010.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. **OLIVEIRA, EDER SILVA DE**; JUNGES, ANGELA; SBARAINI, NICOLAU; ANDREIS, FÁBIO CARRER; THOMPSON, CLAUDIA ELIZABETH; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN; SCHRANK, AUGUSTO. Molecular evolution and transcriptional profile of GH3 and GH20 β -N-acetylglucosaminidases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Genetics And Molecular Biology*, 2018.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. **OLIVEIRA, E. S.**; JUNGES, A.; PAIXÃO, R. L. A.; RISPOLI, T.; SBARAINI, N.; STAATS, C. C.; SCHRANK, AUGUSTO. Estudo funcional de N-acetil-glicosaminidases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Anais do 27 CBM, 2013.

2. JUNGES, A.; PAIXÃO, R. L. A.; **OLIVEIRA, E. S.**; SBARAINI, N.; RISPOLI, T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Functional analysis from *Metarhizium anisopliae* subgroup C chitinases. In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Anais do 27 CBM, 2013.

3. PAIXÃO, R. L. A.; JUNGES, A.; **OLIVEIRA, E. S.**; STAATS, C. C.; SCHRANK, A. Gene silencing mediated by RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In: 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Anais do 27 CBM, 2013.

4. **OLIVEIRA, E. S.;** VAINSTEIN, M. H.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A. Functional analysis of glyoxal oxidases of *Cryptococcus neoformans*. In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre, RS. Anais da XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.
5. **OLIVEIRA, E. S.;** VAINSTEIN, M. H.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A. Glyoxal oxidases in *Cryptococcus neoformans*. In: 28º Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu, PR. Anais da 28º Reunião de Genética de Microrganismos, 2012.
6. **OLIVEIRA, E. S.;** STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Estudo funcional de três glioxal oxidases de *Cryptococcus neoformans*. In: XIII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2011, Porto Alegre, RS. Anais da XIII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2011.
7. **OLIVEIRA, E. S.;** STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identificação *in silico* de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol nas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*. In: 27º Reunião de Genética de Microrganismos, 2010, Guarujá, SP. Anais da 27º Reunião de Genética de Microrganismos, 2010.
8. **OLIVEIRA, E. S.;** STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identificação *in silico* de proteínas GPI-ancoradas nas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*. In: XII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre, RS. Anais da XII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010.
9. **OLIVEIRA, E. S.;** STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identificação *in silico* de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol nas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*. In: XI Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre, RS. Anais da XI Reunião anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009.
10. **OLIVEIRA, E. S.;** STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Homeostase do ferro: busca por proteínas ortólogas em *Cryptococcus gattii* e *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 26º Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador, BA. Anais da 26º Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.
11. **OLIVEIRA, E. S.;** CRESTANI, J.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identificação

de proteínas diferencialmente expressas em *Cryptococcus gattii* sob limitação de ferro. In: XX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2008, Porto Alegre. Anais do XX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2008.

12. CRESTANI, J.; **OLIVEIRA, E. S.**; SILVA, L. K. R.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Proteomics of iron deprivation in *Cryptococcus gattii*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

13. CRESTANI, J.; **OLIVEIRA, E. S.**; SILVA, L. K. R.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Proteomics of iron deprivation in *Cryptococcus gattii*. In: 26º Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador. Anais da 26º Reunião de Genética de Microrganismos, 2008.

14. **OLIVEIRA, E. S.**; RODRIGUES, R. S. B.; VAINSTEIN, M. H. Purificação de uma lipase extracelular da levedura *Pseudozyma hubeiensis* para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. In: XIX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2007, Porto Alegre. Anais do XIX Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2007.

15. RODRIGUES, R. S. B.; **OLIVEIRA, E. S.**; FUENTEFRIA, ALEXANDRE MENEGHELLO; VALENTE, P.; VAINSTEIN, M. H. Produção e imobilização da lipase de *Pseudozyma hubeiensis* para utilização em aplicações biotecnológicas In: ENZITEC: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2006, Caxias do Sul. Anais do ENZITEC: VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2006.

16. **OLIVEIRA, E. S.**; RODRIGUES, R. S. B.; LUBECK, I.; VAINSTEIN, M. H. Purificação de uma lipase extracelular da levedura *Pseudozyma hubeiensis* para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. In: XXVIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2006, Porto Alegre. Anais do XXVIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2006.

17. **OLIVEIRA, E. S.**; RODRIGUES, R. S. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Produção e purificação de uma lipase da levedura *Pseudozyma hubeiensis* para sua utilização como catalisador na produção de biodiesel. In: XVII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2005, Porto Alegre. Anais do XVII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2005.

DEMAIS PRODUÇÕES

1. **OLIVEIRA, E. S.**, et al. **Curso de Férias - Verão 2011: Plantas, como funcionam?**, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. **OLIVEIRA, E. S.**, et al. **Curso de Férias - Verão 2010: As células**, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. **OLIVEIRA, E. S.**, et al. **Curso de Férias - Verão 2010: As células**, 2010. (Outro, Organização de evento)
2. **OLIVEIRA, E. S.**, et al. **V Jornada acadêmica da Biologia da UFRGS**, 2008. (Outro, Organização de evento)
3. **OLIVEIRA, E. S.**, et al. **Primeiro Programa de Minicursos Complementares da Biologia UFRGS**, 2006. (Outro, Organização de evento)

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE COMISSÕES JULGADORAS

1. **OLIVEIRA, E. S.**; **SILVA, C. S.**; **FERREIRA, A. A.**. Banca examinadora da prova didática do Concurso para Docente, Edital 19/2016, Área/Disciplina de Biologia do IFRS - *Campus* Canoas. 2016. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. (Concurso Público)
2. **OLIVEIRA, E. S.** Comissão avaliadora da VI Mostra de Ciência e Tecnologia do IFRS-*Campus* Caxias do Sul (VI IFTec). 2017. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. (Outras participações)